

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BOZADA PREBİYOTİK VE PROBİYOTİKLERİN AFLATOKSİN
B1 DETOKSİFİKASYONU VE BİYOERİŞİLEBİLİRLİĞİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

Uzm. Dyt. Arife MACİT

Beslenme ve Diyetetik Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA

2024

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BOZADA PREBİYOTİK VE PROBİYOTİKLERİN AFLATOKSİN
B1 DETOKSİFİKASYONU VE BİYOERİŞİLEBİLİRLİĞİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

Uzm. Dyt. Arife MACİT

Beslenme ve Diyetetik Programı
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mevlüde KIZIL

ANKARA

2024

ONAY SAYFASI

**BOZADA PREBİYOTİK VE PROBİYOTİKLERİN AFLATOKSİN B1 DETOKSİFİKASYONU
VE BİYOERİŞİLEBİLİRLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Arife MACİT

Danışman: Prof. Dr. Mevlüde KIZIL

Bu tez çalışması 05.08.2024 tarihinde jürimiz tarafından "Beslenme ve Diyetetik Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	<i>Prof. Dr. Seyit Mehmet MERCANLIGİL</i> <i>Uluslararası Kıbrıs Üniversitesi</i>
Üye:	<i>Prof. Dr. Emine Akal YILDIZ</i> <i>Doğu Akdeniz Üniversitesi</i>
Üye:	<i>Prof. Dr. Fatma Gülhan SAMUR</i> <i>Hacettepe Üniversitesi</i>
Üye:	<i>Prof. Dr. Aylin AYZ</i> <i>Hacettepe Üniversitesi</i>
Üye:	<i>Dr. Öğr. Üyesi Damla GÜMÜŞ</i> <i>Hacettepe Üniversitesi</i>

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

07 Ağustos 2024

Prof. Dr. Müge YEMİŞCI 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⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

05 / 08 / 2024

Uzm. Dyt. Arife MACİT

1“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 paylaşılması 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, sağlık 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. Arife MACİT

TEŞEKKÜR

Lisans, yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca bana hep yol göstererek desteğini, sabrını ve bilgisini esirgemeyen, birlikte çalışmaktan mutluluk ve onur duyduğum değerli danışman hocam Prof. Dr. Mevlüde Kızıl'a,

Tez izleme komitesinde görev alarak çalışmaya önemli katkılarda bulunan değerli hocalarım Prof. Dr. Seyit Mehmet Mercanlıgil ve Prof. Dr. Aylin Ayaz'a,

Çalışma süresince yardımlarını esirgemeyerek verdiği her türlü destek için Sayın Prof. Dr. Banu Sancak'a,

Tez çalışmam süresince hem bilimsel hem manevi destek ve yardımları için Dr. Öğr. Üyesi Sümeyra Sevim Karacif'e,

Tüm zor zamanlarımda desteğini her zaman hissettiğim ve her daim motivasyon kaynağım olan canım dostum Arş. Gör. Büşra Turan Demirci'ye,

Desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Dr. Zeynep Nur Köseoğlu, Arş. Gör. Kübra Uçar Baş, Arş. Gör. Nagihan Kırçalı Haznedar ve Arş. Gör. Tuba Nur Yıldız Kopuz'a,

Aramızdaki tüm fiziksel mesafelere rağmen her daim yanımda olduklarını hissettiren değerli dostlarım Sümeyra Bukan, Büşra Buzgan, Neslihan Dursun ve Hatice Köse'ye,

Hayatlarının her anını bizlere adayan, karşılaştığım her zorluğu benimle birlikte göğüsleyerek her daim yanımda olan, en büyük destekçilerim olan ve teşekkürlerin en büyüğünü hak eden canım anneme, tezimin biteceği günü görmeyi çok isteyen ancak şu an aramızda olamayan canım babama,

Her koşulda, mesafeler ne olursa olsun, her zaman yanımda hissettiğim canım kardeşlerime, onların değerli eşlerine ve sevgili yeğenlerime, Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Macit, A., Bozada Prebiyotik ve Probiyotiklerin Aflatoksin B1 Detoksifikasyonu ve Biyoerişilebilirliği Üzerine Etkisi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beslenme ve Diyetetik Programı Doktora Tezi, Ankara, 2024. Aflatoksin B1 (AFB1), karsinojenik, mutajenik, teratojenik, nörotoksik ve immünosupresif özelliklere sahip, çeşitli tahıl ürünleri ve yağlı tohumlarda sıkça bulunan bir mikotoksindir. Bu çalışmanın amacı, biyolojik ajan olan probiyotik bakteri olarak *Lactobacillus leichmannii* (ATCC 10697) RSKK 06048, maya olarak *Saccharomyces boulardii* RSKK 06047, prebiyotik olarak beta glukanın tahıl bazlı fermente içecek olan bozada AFB1 bağlama kapasitesinin ve AFB1 biyoerişilebilirliği üzerine etkisinin *in vitro* olarak incelenmesidir. Oluşturulan çalışma gruplarındaki (pozitif ve negatif kontrol, AFB1 + *L. leichmannii*, AFB1 + *S. boulardii*, AFB1+ *L. leichmannii* + *S. boulardii*, AFB1 + Beta glukun, AFB1 + *L. leichmannii* + Beta glukun, AFB1 + *S. boulardii* + Beta glukun, AFB1+ *L. leichmannii* + *S. boulardii* + Beta glukun) serbest AFB1 miktarı, inkübasyondan sonra ve *in vitro* sindirim modeli ile mide, ince bağırsak ve kolon aşamalarından sonra HPLC kullanılarak belirlenmiştir. İnkübasyon sonrası en yüksek AFB1 bağlanması *S. boulardii* içeren örnekte $27,79 \pm 1,95$ olarak gözlenmiştir. Bu çalışma, inkübasyon sonrası üründe belirlenen AFB1 miktarları ile sindirim simülasyonu sonundaki miktarlar arasındaki farkı göstermiştir. *In vitro* sindirim modeli uygulandığında, bozadaki AFB1'in biyoerişilebilirliği mide aşamasından sonra $92,46 \pm 0,82$; ince bağırsak aşamasından sonra $87,80 \pm 2,60$; kolon aşamasından sonra ise $78,08 \pm 0,26$ olarak bulunmuştur. Kolon sonrası AFB1 biyoerişilebilirliğinin, inkübasyon sonrası AFB1 değerleriyle karşılaştırıldığında tüm örneklerde anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). AFB1 biyoerişilebilirliğindeki en yüksek azalma kolon sonrası *L. leichmannii* + *S. boulardii* + Beta glukun içeren örnekte $55,46 \pm 6,81$ olarak gözlemlenmiştir. Beta glukun içeren örnekte inkübasyon sonrasında belirlenen bağlanma oranı ($20,89 \pm 0,78$) ile *in vitro* sindirimde kolon sonrası bağlanma oranı ($41,02 \pm 1,60$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). Bu araştırma ile, probiyotik bakteri, maya ve beta glukunun tahıl bazlı ürünlerde AFB1 biyoerişilebilirliğini azaltmak için potansiyel bir uygulama olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Aflatoksin B1, *in vitro* sindirim, biyoerişilebilirlik, probiyotik, prebiyotik, beta glukun, boza

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi BAP tarafından desteklenmiştir (Proje numarası: TDK-2022-19930)

ABSTRACT

Macit, A., The Effect of Prebiotic and Probiotics on Aflatoxin B1 Detoxification and Bioaccessibility in Boza, Hacettepe University Graduate School Health Sciences Program of Nutrition and Dietetics, Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2024. Aflatoxin B1 (AFB1) is a mycotoxin with carcinogenic, mutagenic, teratogenic, neurotoxic and immunosuppressive properties commonly found in various cereal products and oilseeds. The aim of this study was to investigate the effect of *Lactobacillus leichmannii* (ATCC 10697) RSKK 06048 as a probiotic bacteria, *Saccharomyces boulardii* RSKK 06047 as a yeast and beta-glucan as a prebiotic on AFB1 binding capacity and AFB1 bioaccessibility in boza which is a cereal-based fermented beverage. The free AFB1 levels in the study groups (positive and negative control, AFB1 + *L. leichmannii*, AFB1 + *S. boulardii*, AFB1 + *L. leichmannii* + *S. boulardii*, AFB1 + Beta glucan, AFB1 + *L. leichmannii* + Beta glucan, AFB1 + *S. boulardii* + Beta glucan, AFB1 + *L. leichmannii* + *S. boulardii* + Beta glucan) were determined by HPLC after incubation and after stomach, intestine and colon stages with *in vitro* digestion model. After incubation, the highest AFB1 binding was observed as $27.79 \pm 1.95\%$ in the sample containing *S. boulardii*. This study showed the difference between the amounts of AFB1 determined in the product after incubation and at the end of the digestion simulation. When the *in vitro* digestion model was applied, the bioaccessibility of AFB1 in boza was $92.46 \pm 0.82\%$ after the stomach stage, $87.80 \pm 2.60\%$ after the small intestine stage, and $78.08 \pm 0.26\%$ after the colon stage. The bioaccessibility of AFB1 after the colon stage showed a significant decrease compared to the AFB1 values after incubation in all samples ($p < 0.05$). The highest decrease in AFB1 bioaccessibility was observed as $55.46 \pm 6.81\%$ in the sample containing *L. leichmannii* + *S. boulardii* + Beta glucan after the column. The binding capacity determined after incubation in the sample containing beta-glucan (20.89 ± 0.78) showed a statistically significant increase compared to the binding capacity after colon stage *in vitro* digestion (41.02 ± 1.60) ($p < 0.05$). This research concluded that probiotic bacteria, yeast and beta glucan could be used as a potential application to reduce AFB1 bioaccessibility in cereal-based products.

Keywords: Aflatoxin B1, *in vitro* digestion, bioaccessibility, probiotic, prebiotic, beta glucan, boza

This study was supported by Hacettepe University BAP (Project number: TDK-2022-19930)

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	xi
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Kuramsal Yaklaşımlar ve Kapsam	1
1.2. Amaç ve Varsayımlar	3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Mikotoksinler	4
2.1.1. Aflatoksin	4
2.1.2. Aflatoksin B1 Özellikleri, Metabolizması ve Sağlık İlişkisi	5
2.1.3. Aflatoksin Azaltma Yöntemleri	8
2.2. Probiyotikler	9
2.3. Prebiyotik: Beta glukan	11
2.4. Prebiyotiklerin Aflatoksin Bağlayıcı Özelliği	11
2.5. Probiyotiklerin Aflatoksin Bağlayıcı Özelliği	12
2.6. Aflatoksin B1 Biyoerişilebilirliği ile ilgili <i>İn Vitro</i> Sindirim Çalışmaları	18
3. GEREÇ ve YÖNTEM	21
3.1. Gereç	21
3.2. Yöntem	22
3.2.1. Boza Örneklerinin Hazırlanması	22
3.2.2. Aflatoksin B1 Standart Çözeltilisinin Hazırlanması	22
3.2.3. Liyofilize Maya ve Bakteri Kültürünün Hazırlanması	23
3.2.4. Aflatoksin B1 ile Kontamine Edilmiş Boza Örneklerinin Hazırlanması	23

3.2.5. AFB1 Biyoerişilebilirliği için <i>İn Vitro</i> Sindirim Modelinin Uygulanması	25
3.2.6. Aflatoksin B1 Analizi	29
3.2.7. İstatistiksel Değerlendirme	30
4. BULGULAR	31
4.1. Bozada Probiyotik Maya, Bakteri ve Beta Glukanın İnkübasyon Sonrası Aflatoksin B1 Bağlanma Düzeyleri	31
4.2. Probiyotik Maya ve Bakteri ile Beta Glukanın Bozada AFB1 Biyoerişilebilirliği Üzerine Etkisi	34
4.2.1. Probiyotik Maya ve Bakteri ile Beta Glukanın Mide Sonrası Bozada AFB1 Biyoerişilebilirliği Üzerine Etkisi	34
4.2.2. Probiyotik Maya ve Bakteri ile Beta Glukanın İnce Bağırsak Sonrası Bozada AFB1 Biyoerişilebilirliği Üzerine Etkisi	36
4.2.3. Probiyotik Maya ve Bakteri ile Beta Glukanın Kolon Sonrası Bozada AFB1 Biyoerişilebilirliği Üzerine Etkisi	37
4.3. Probiyotik Maya, Bakteri ve Beta Glukanın Bozada AFB1 Bağlanma Düzeylerine İnkübasyon ve <i>İn Vitro</i> Sindirim Sonrası Etkisi	38
5. TARTIŞMA	42
5.1. Probiyotik Maya ve Bakteri ile Beta Glukanın Bozada Aflatoksin B1'e Bağlanma Düzeyleri	43
5.2. Probiyotik Maya ve Bakteri ile Beta Glukanın Bozada Biyoerişilebilirliği Üzerine Etkisi	47
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	52
6.1. Sonuçlar	52
6.2. Öneriler	55
7. KAYNAKLAR	56
8. EKLER	66
EK 1. Dijital Makbuz	
EK 2. Orijinallik Ekran Çıktısı	
9. ÖZGEÇMİŞ	68

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	<i>Aspergillus</i>
AFB0	Aflatoksin B1-8,9-epoksit
AFB1	Aflatoksin B1
AFB2	Aflatoksin B2
AFB2a	Aflatoksin B2a
AFG1	Aflatoksin G1
AFG2	Aflatoksin G2
AFM1	Aflatoksin M1
AFM2	Aflatoksin M2
AFP1	Aflatoksin P1
AFQ1	Aflatoksin Q1
ANOVA	Tek Yönlü Varyans Analizi
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists (Resmi Tarım Kimyagerleri Derneği)
B.	<i>Bifidobacterium</i>
BSA	Sığır Serum Albümini
CaCl₂	Kalsiyum Klorür
CYP450	Sitokrom P450 enzimleri
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EH	Epoksit Hidrolaz.
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
g	Gram
GRAS	Generally Recognized as Safe (Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen)
GST	Glutatyon S-Transferaz
GST	Glutatyon S-Transferaz, SOD: Süperoksit Dismutaz, EH: Epoksit Hidrolaz.
HCl	Hidroklorik Asit
HNO₃	Nitrik Asit
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IARC	International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu)

KBr	Potasyum Bromür
KCl	Potasyum klorür
kg	Kilogram
KH₂PO₄	Monopotasyum Fosfat
kob	Koloni Oluşturan Birim
KSCN	Potasyum Tiyosiyanat
L	Litre
L.	<i>Lactobacillus</i>
LOD	Limit of Detection (Saptama Sınırı)
LOQ	Limit of Quantification (Ölçüm Limiti)
mg	Miligram
MgCl₂	Magnezyum klorür
mL	Mililitre
MRS	De Man, Rogosa ve Sharpe
N₂	Azot
NaCl	Sodyum klorür
NaH₂PO₄	Monosodyum fosfat
NaHCO₃	Sodyum bikarbonat
NaSO₄	Sodyum sülfat
ng	Nanogram
NH₄Cl	Amonyum klorür
nm	Nanometre
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz
RIVM	Ulusal Halk Sağlığı ve Çevre Enstitüsü
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RSD	Relative Standard Deviation (Bağıl Standart Sapma)
S.	<i>Saccharomyces</i>
SOD	Süperoksit Dismutaz
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences" (Sosyal Bilimler için İstatistik Paketi)
v	Hacim
xg	Relatif Santrifüj Kuvveti (RCF)

YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose (Maya özütü Peptonlu Dekstroz)
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre



ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. AFB1'in kimyasal yapısı.	5
2.2. AFB1'in doku ve organlara dağılımı.	6
2.3. AFB1 vücuttaki metabolizması.	7
2.4. AFB1'in laktik asit bakterileri tarafından adsorpsiyonu için potansiyel mekanizmanın şematik gösterimi.	14
3.1. Bozaya ait HPLC kromatogramı.	22
3.2. Boza örneklerinin çalışma grupları.	24
3.3. Uygulanan <i>in vitro</i> sindirim bileşenleri.	26
3.4. <i>İn vitro</i> sindirim modelinin uygulama aşamaları.	27
3.5. Örneklerin analiz aşamaları.	28
3.6. Aflatoksin B1'e özgü immünoafinite kolon kullanarak vakum manifoldunda AFB1'in ekstraksiyonu.	29
4.1. İnkübasyon sonrası probiyotik bakteri ve maya ile beta glukanın bozada AFB1'e bağlanma seviyeleri.	32
4.2. İnkübasyon sonrasında pozitif kontrol örneklerindeki AFB1 düzeyinin HPLC kromatogramı.	32
4.3. İnkübasyon sonrasında negatif kontrol örneklerindeki AFB1 düzeyinin HPLC kromatogramı.	33
4.4. İnkübasyon sonrasında <i>S. boulardii</i> 'nin bulunan örneklerdeki AFB1 düzeyinin HPLC kromatogramı.	33
4.5. İnkübasyon sonrasında <i>L. leichmannii</i> + <i>S. boulardii</i> + Beta glukanın bulunan örneklerdeki AFB1 düzeyinin HPLC kromatogramı.	33
4.6. Çalışma gruplarında <i>in vitro</i> sindirim modeli kullanılarak mide sonrası bozada ölçülen AFB1 biyoerişilebilirlik seviyeleri.	35
4.7. Çalışma gruplarında <i>in vitro</i> sindirim modeli kullanılarak ince bağırsak sonrası bozada ölçülen AFB1 biyoerişilebilirlik seviyeleri.	37
4.8. Çalışma gruplarında <i>in vitro</i> sindirim modeli kullanılarak kolon sonrası bozada ölçülen AFB1 biyoerişilebilirlik seviyeleri.	38
4.9. Çalışma gruplarında, bozada inkübasyon ile mide, ince bağırsak ve kolon <i>in vitro</i> sindirimi sonrasında ölçülen AFB1 bağlanma oranları.	41

TABLolar

Tablo		Sayfa
2.1.	Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'ne göre bazı besinlerde AFB1 için izin verilen miktarlar.	8
2.2.	Probiyotik mikroorganizma türleri.	10
2.3.	Aflatoksin B1'in bağlanmasıyla ilgili probiyotikler ve prebiyotikler üzerine yapılan çalışmalar.	15
2.4.	Aflatoksin B1 biyoerişilebilirliği ile ilgili <i>in vitro</i> sindirim çalışmaları.	20
3.1.	AFB1 geri kazanım, LOD, LOQ ve RSD değerleri.	30
4.1.	İnkübasyon sonrası probiyotik bakteri ve maya ile beta glukanın bozada AFB1 bağlanma düzeyleri.	31
4.2.	<i>In vitro</i> sindirim modeli kullanılarak bozada mide sonrası ölçülen AFB1 biyoerişilebilirlik seviyeleri.	35
4.3.	<i>In vitro</i> sindirim modeli kullanılarak bozada ince bağırsak sonrası ölçülen AFB1 biyoerişilebilirlik seviyeleri.	36
4.4.	<i>In vitro</i> sindirim modeli kullanılarak bozada kolon sonrası ölçülen AFB1 biyoerişilebilirlik seviyeleri.	38
4.5.	Çalışma gruplarında, bozada inkübasyon ve <i>in vitro</i> sindirim modeli sonrasında ölçülen AFB1 bağlanma oranları.	40

1. GİRİŞ

1.1. Kuramsal Yaklaşımlar ve Kapsam

Aflatoksin, bazı *Aspergillus* (A) türleri, özellikle *A. flavus*, *A. nomius* ve *A. paraciticus* tarafından üretilen oldukça toksik mikotoksindir (1). Aflatoksinlerin 20'den fazla türü tanımlanmıştır, ancak doğal olarak toksijenik mantarlar tarafından sentezlenen türleri aflatoksin B1 (AFB1), aflatoksin B2 (AFB2), aflatoksin G1 (AFG1) ve aflatoksin G2 (AFG2)'dir. Bunlar arasında AFB1, besinlerde en yaygın olan türdür ve diğer üçü genellikle AFB1'in yokluğunda gözlenmez. Aflatoksin M1 (AFM1) ve aflatoksin M2 (AFM2) ise sırasıyla AFB1 ve AFB2'nin hidroksile metabolitleridir (2). Aflatoksin bulaşmış gıda ve yemlerin alımı, karsinojenik, mutajenik, teratojenik, nörotoksik, östrojenik ve immün baskılayıcı etkiler dahil olmak üzere akut ve kronik aflatoksikoza yol açabilir (3-5). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), AFB1'i insanlar için karsinojen olan grup I olarak sınıflandırmıştır (6).

Aflatoksinler ağırlıklı olarak yağlı tohumlar, kuruyemişler, baharatlar, kakao çekirdeği, mısır ve diğer tahıllarda bulunmaktadır. Kavurma ve fırınlama gibi termal besin işleme işlemleri ile öğütme ve fermentasyon gibi termal olmayan işlemler, aflatoksin seviyelerinde düşüşe neden olabilir, ancak tamamen ortadan kaldırmazlar (7). Tüketiciyi korumak için mikotoksinlere maruziyetin mümkün olduğu kadar düşük tutulması gerekir. Pek çok ülkede, belirlenen kabul edilebilir sınırlarla besinlerdeki mikotoksinleri düzenleyen düzenlemeler vardır ve bunların çoğu, farklı besin maddeleri için izin verilen maksimum veya kabul edilebilir bir seviyeye sahiptir. Dünyanın farklı yerlerinde gıda kodekslerinde, aflatoksin maksimum kabul edilebilir seviyesi, çeşitli yiyecek türlerinde AFB1 için 1–20 µg/kg, toplam aflatoksinler (AFB1, AFB2, AFG1 ve AFG2) için 10–30 µg/kg olarak belirlenmiştir (2). Ülkemizde Türk Gıda Kodeksi'nde AFB1'in maksimum kabul edilebilir seviyeleri 2-12 µg/kg olarak belirlenmiştir (8).

Fermentasyon, tahıl bazlı gıdalardaki aflatoksin konsantrasyonunu azaltmanın bir yolu olarak kullanılmaktadır (9). Bununla birlikte, geleneksel fermentasyonlarda başlangıç kültürlerinin tanımlanmamış olması ile ilişkili ürün kalitesi ve güvenliğindeki değişiklikler bu yaklaşım için bir engel oluşturmaktadır. Probiyotik laktik asit bakterilerinin tahıl bazlı gıdalarda kullanılması ile aflatoksinlerin kontrollü

bir şekilde detoksifiye edildiğine dair literatürde çalışmalar mevcuttur (10-12). Probiyotikler, yeterli miktarlarda alındığında konakçı üzerinde birçok sağlık yararı sağlayabilen canlı mikroorganizmalardır (13). Bazı probiyotik suşlar, mikotoksinlere bağlanma kapasitesi nedeniyle aflatoksinlerin toksisitesini azaltmak veya insan bağırsağında emilimini önlemek için potansiyel bir biyolojik yöntem olarak önerilmektedir (10, 14). AFB1 detoksifikasyonu üzerine yapılan çalışmalarda probiyotiklerin etkili olduğunu gösteren anlamlı bulgular elde edilmiştir. *Lactobacillus (L.) rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. pentosus*, *L. reuteri*, *Bifidobacterium (B.) longum*, *B. bifidum*, *B. breve* ve diğer birçok probiyotik türlerinin AFB1 düzeyini anlamlı derecede azalttığı ve biyoerişilebilirliğini düşürdüğü çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (15-18).

Prebiyotikler, gastrointestinal sistemin üst kısmında hidrolize ve absorbe olmadan kolona ulaşabilen ve probiyotiklerin çoğalmasını destekleyen sindirilmeyen karbonhidratlar olarak tanımlanır (19). Beta glukan, sağlık üzerinde önemli bir rol oynayan suda çözünür, prebiyotik ve biyoaktif bir polisakkarittir. Beta glukan, antikanser, antidiyabetik, immün modülatör ve anti-inflamatuar özelliklere sahiptir (20). *L. acidophilus* ile birlikte prebiyotiklerin kombine edilerek kullanıldığı bir çalışmada, prebiyotik ve probiyotiklerin beraber kullanılması, probiyotiklerin AFB1 toksinine bağlanma gücünü arttırmış ve AFB1 biyoerişilebilirliğinin azaldığı bildirilmiştir (21).

In vitro sindirim modelleri, sindirim sistemindeki ağız, mide ve ince bağırsakta sindirim süreçlerini basitleştirilmiş bir şekilde simüle ederek, bileşiklerin gastrointestinal sistemden geçiş sırasında matrislerinden biyolojik olarak erişilebilirliğinin araştırılmasını mümkün kılar. *In vitro* sindirim modeli, insan fizyolojisine (sindirim sıvılarının kimyasal bileşimi, pH ve her bölme için tipik kalış süreleri) dayanmalıdır ve numune almak için kullanılan bölme, sindirimin gerçekleştiği gastrointestinal sistemin bölümünü temsil etmelidir (22).

Kabak ve Özbey (23), aflatoksinlerin biyolojik erişilebilirliğini azaltmada altı farklı probiyotik bakteri ile bir *in vitro* sindirim modeli kullanarak çeşitli besin matrislerinde (fındık, fıstık, kuru incir, kırmızı biber, buğday ve mısır) aflatoksinlerin biyoerişilebilirliğini incelemiştir. Aflatoksinlerin besin matrisinden biyoerişilebilirliği, AFB1 için %85,1 ile %98,1 arasında değişmektedir. Probiyotik

bakterilerin dahil edilmesi ile AFB1'in biyoerişilebilirliği %35,6 olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde yapılan çalışmalarda, probiyotiklerin AFB1'in biyoerişilebilirliğini farklı düzeylerde azalttığı bildirilmiştir (16, 18).

1.2. Amaç ve Varsayımlar

Amaç:

Bu çalışmada, prebiyotik ve probiyotik gibi biyolojik ajanların, *in vitro* olarak AFB1 detoksifikasyonu ve biyoerişilebilirliği üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Varsayımlar:

1. Probiyotik bir bakteri olan *Lactobacillus leichmannii* AFB1'e bağlanarak bozada AFB1 seviyesini azaltır.
2. Probiyotik bir maya olan *Saccharomyces boulardii* AFB1'e bağlanarak bozada AFB1 seviyesini azaltır.
3. Prebiyotik olan beta-glukan, probiyotiklerin bozada AFB1'e bağlanma kapasitelerini artırır.
4. Prebiyotik ve probiyotikler AFB1'in biyoerişilebilirliğini azaltır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikotoksinler

Mikotoksinler, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps* ve *Alternaria*'nın belirli türleri tarafından üretilen doğal olarak oluşan toksinlerdir (24). Mikotoksinler genellikle genotipik olarak spesifiktir ancak bir veya daha fazla mantar türü tarafından üretilir (25). Mikotoksinler, insanlarda ve hayvanlarda karsinogen, mutajenik, teratojenik, immüno-supresif ve endokrin bozucu etkilere yol açan akut ve kronik etkilere neden olabilir (26). Karaciğer, böbrek, sinir sistemi ve endokrin olmak üzere birçok organı ve sistemi etkileyebilmektedirler (24).

Beş yüzden fazla mikotoksinin potansiyel olarak toksik olduğu rapor edilmiştir. İnsan ve hayvan sağlığını etkileyen başlıca mikotoksinler arasında aflatoksin, okratoksin, fumonisin, zearalenon, patulin, trikotesen ve sitrinin yer alır (24). Esas olarak *Aspergillus* türleri tarafından üretilen aflatoksinler, en tehlikeli mikotoksinler olarak kabul edilmektedir (27).

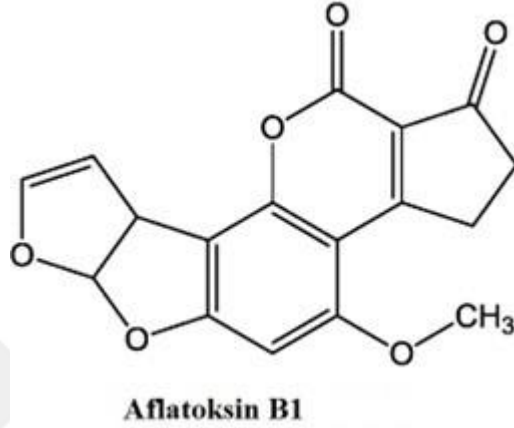
2.1.1. Aflatoksin

Aflatoksinler, *A. flavus*, *A. nomius* ve *A. parasiticus* gibi *Aspergillus* türünden üretilen ikincil metabolitlerdir. İnsan ve hayvanlarda toksik etkilere neden olan ve besinlerde doğal olarak gelişen bileşiklerdir (1). Aflatoksinler ilk olarak yaklaşık altmış yıl önce İngiltere de yüz binden fazla hindinin aniden şiddetli bağırsak iltihabı ve karaciğer nekrozu gibi aşırı zehirlenmenin klinik belirtilerini göstererek öldüğü "Turkey X hastalığı" salgını sonrasında keşfedilmiştir. Bu salgının, hayvanların tükettiği Brezilya yer fıstığının yüksek miktarda *A. flavus* mantarı ve bu mantarın ürettiği toksinlerden kaynaklandığı belirlenmiştir (28-30).

Aflatoksin moleküllerinin 20'den fazla türü vardır, ancak en belirgin olanları AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1, ve AFM2'dir. Aflatoksin B1, B2, G1 ve G2 genellikle tahıl, baharat ve kuru meyveler gibi kuru gıda ürünlerinde bulunurken, AFM1 ve AFM2 gibi aflatoksin metabolitleri ise sütte tespit edilmektedir (31).

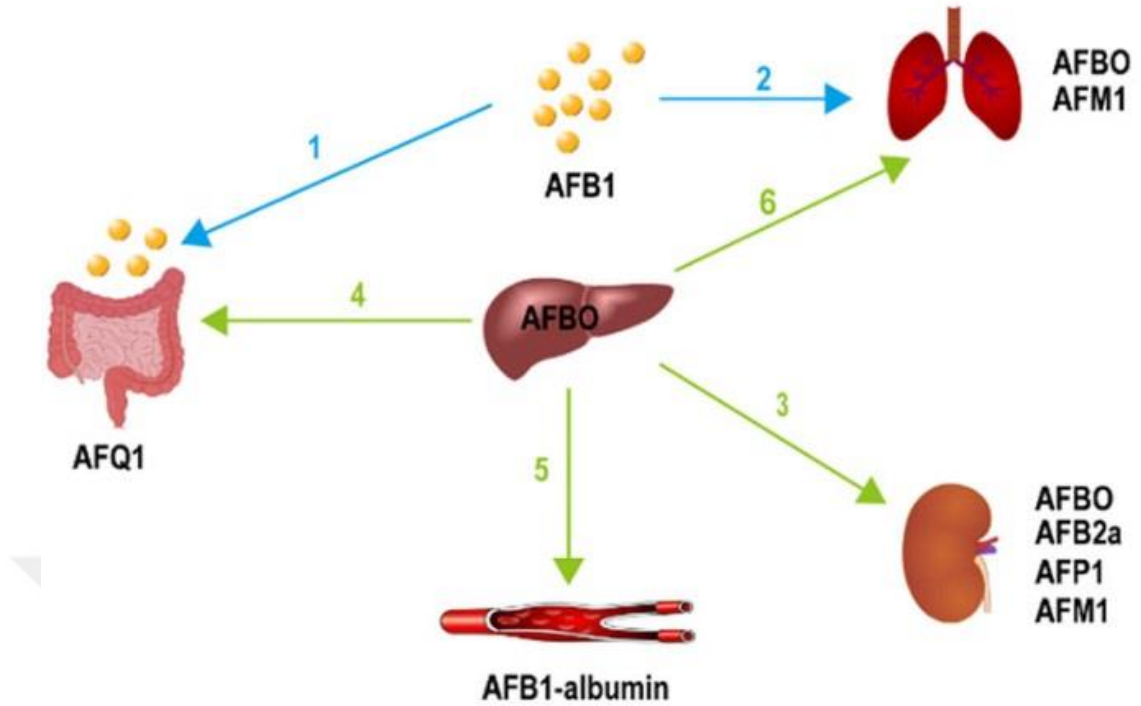
2.1.2. Aflatoksin B1 Özellikleri, Metabolizması ve Sağlık İlişkisi

Aflatoksinler arasında AFB1 en yaygın ve en zararlı olanı kabul edilir (28). Aflatoksin B1, suda az çözünür, polar olmayan çözücülerde çözünmez ve polar organik çözücülerde serbestçe çözünür (32). Şekil 2.1.'de AFB1'in kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.1. AFB1'in kimyasal yapısı

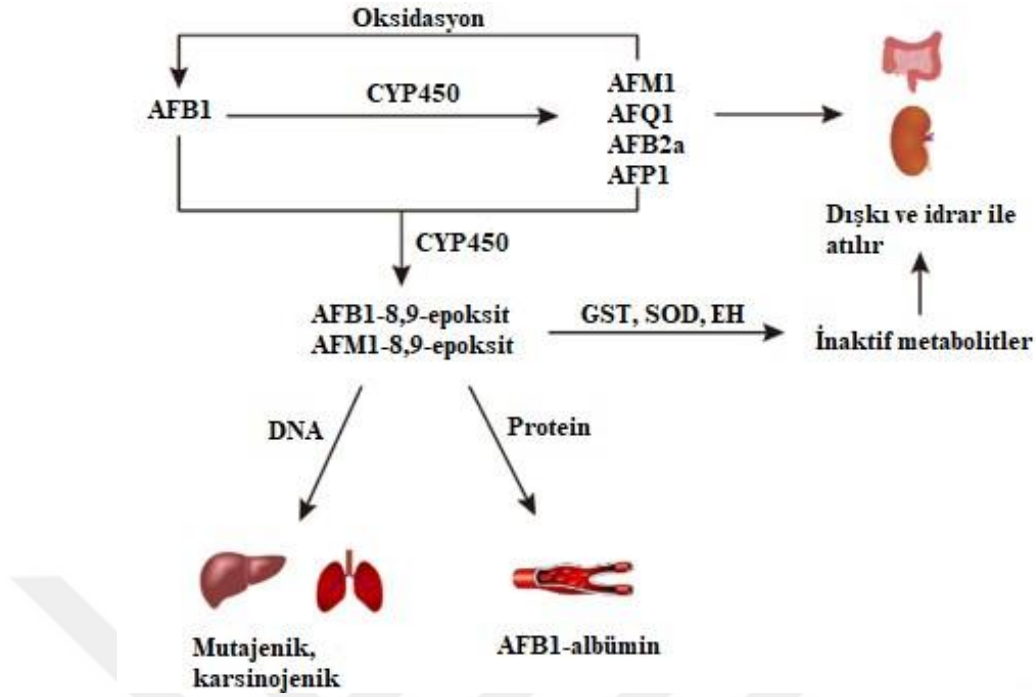
AFB1 içeren bir diyetin alınmasından sonra, AFB1'in yaklaşık %50'si duodenumda emilir (33). Emilmeyen AFB1 ise, vücuda zarar vermeden dışkı yoluyla atılır. Emilen AFB1 esas olarak karaciğerde, ardından böbreklerde dağılır ve küçük bir miktar da serbest AFB1 veya suda çözünebilen metabolitleri şeklinde mezenterik damarda dağıtılır. Solunum yolu ve deri yoluyla vücuda girer, kanda dolaşarak metabolizma ve emilim için ilgili dokulara yerleşir (Şekil 2.2) (28).



Şekil 2.2. AFB1'in doku ve organlara dağılımı (28). (1, AFB1 bağırsaktan emilir; 2, AFB1 solunum yoluyla maruz kaldığında akciğerlere girebilir; 3–4, AFB1 ve metabolitleri esas olarak idrar ve dışkıyla atılır; 5, AFB1 albümin ile kanda kalabilir; 6, Karaciğer metabolizması tarafından dönüştürülen AFB1, akciğer dokusuna zarar verebilir.)

AFB1: Aflatoksin B1, AFQ1: Aflatoksin Q1, AFBO: Aflatoksin B1-8,9-epoksit, AFB2a: Aflatoksin B2a, AFP1: Aflatoksin P1, AFM1: Aflatoksin M1.

Aflatoksin B1'in metabolizması esas olarak karaciğerde gerçekleşir (34). Emilen AFB1'in vücuda girdikten sonra, sitokrom P450 enzimleri (CYP1A2, CCYP3A4, CYP2A6 vb. gibi CYP450 ailesinin üyeleri) tarafından metabolize edilmesi gerekir (35). Şekil 2.3.'te AFB1'in vücuttaki metabolizması gösterilmiştir. AFB1'in AFM1'e dönüşümünde insanlarda CYP1A2 enziminin etkili olduğu belirtilmektedir (36). AFM1 ve AFB1, CYP1A2 ve CYP3A4 metabolitleri tarafından AFM1-8,9-epoksit ve AFB1-8,9-epoksit'e aktive edilebilir. Bu metabolitlerin bazıları vücuttan atılabilir veya albümine ve DNA'ya bağlanarak DNA hasarına yol açabilmekte ve mutajenik, karsinojenik etki gösterebilmektedir (37-39).



Şekil 2.3. AFB1 vücuttaki metabolizması (28).

AFB1: Aflatoksin B1, AFQ1: Aflatoksin Q1, AFBO: Aflatoksin B1-8,9-epoksit, AFB2a: Aflatoksin B2a, AFP1: Aflatoksin P1, AFM1: Aflatoksin M1, DNA: Deoksiribonükleik Asit, CYP450: Sitokrom P450, GST: Glutatyon S-Transferaz, SOD: Süperoksit Dismutaz, EH: Epoksit Hidrolaz.

DNA hasarında ve dolayısıyla karsinogenezde bir diğer önemli rol oksidatif stres tarafından oynanır. Aflatoksin B1'in reaktif oksijen türlerini (ROS) ve oksidatif stresi indüklediği ve mitokondriyal sinyal yoluyla apoptozu indükleyen mitokondriyal ROS'a bağlı sinyal yollarını aktive ettiği bildirilmiştir (40). Aflatoksin B1, memelilerde ve kümes hayvanlarında DNA mutasyonu, karsinojenite, immünotoksisite ve hepatotoksisite de dahil olmak üzere çeşitli olumsuz reaksiyonlar gösterir (41-44).

Dünya nüfusunun yaklaşık 4,5 milyarı, özellikle düşük gelirli ülkelerde, aflatoksin ile kirlenmiş besinlere maruz kalmaktadır (45). AFB1'in çeşitli biyolojik etkilere sahip olduğu, bunlar arasında mutajenite, akut toksisite, karsinojenite ve teratojenite bulunduğu iyi bilinmektedir (46). Epidemiyolojik çalışmalar, AFB1'in yüksek hepatoselüler kanser oranına sahip en hepatokarsinojenik mikotoksin olduğunu rapor etmiştir (47).

İnsanlardaki toksisite, özellikle gelişmekte olan ülkelerde farklı akut zehirlenme salgınları ile ilişkili olarak değerlendirilmiştir (48). Birçok epidemiyolojik

çalışma, aflatoksinlerin kontamine besinler yoluyla alınması ile sağlık sorunları arasındaki bağlantıya odaklanmıştır (49, 50). Birçok *in vitro* çalışma AFB1'in karsinogenitesinin ağırlıklı olarak karaciğerdeki CYP450 tarafından aktivasyon üzerine uygulandığını göstermiş ve toksisite mekanizmasını aydınlatmıştır. Epidemiyolojik, genetik ve deneysel araştırmaların sonucuna dayanarak, Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı (IARC) AFB1'i "Sınıf 1: insan karsinogenleri" olarak sınıflandırmıştır (6).

Aflatoksin B1 ağırlıklı olarak yağlı tohumlar, kuru meyveler, baharatlar ve tahıllarda bulunmaktadır. Tüketiciyi korumak için aflatoksin maruziyetinin mümkün olduğunca düşük tutulması gerekmektedir. Bundan dolayı bu besinlerde AFB1'in bulunmasına izin verilen seviyeler yasal düzenlemelerle belirlenmiştir. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'nde çeşitli besinlerde AFB1 için izin verilen maksimum limitler bildirilmiş ve Tablo 2.1.'de belirtilmiştir (8).

Tablo 2.1. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'ne göre bazı besinlerde AFB1 için izin verilen miktarlar (8).

Besin	Aflatoksin B1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Kurutulmuş meyveler (Kuru incir vs.)	8
Yer fıstığı, Fındık	5
Badem, Antep fıstığı, kayısı çekirdeği	8
Tahıllar	2
Baharatlar	5
Bebek ve küçük çocuk ek gıdası	0,1

Benzer şekilde Avrupa Komisyonu da çeşitli besinlerde izin verilen AFB1 seviyelerini 2-12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ olarak belirlemiştir (51). Yasal düzenlemelere rağmen ülkemizde ve diğer ülkelerde yapılan birçok çalışmada çeşitli besinlerde maksimum limitlerin üzerinde AFB1 tespit edilmiştir (52-56). Bu nedenle, çeşitli besinlerdeki AFB1 seviyelerinin ve maruziyetinin azaltılması amacıyla pratik ve maliyeti düşük yöntemler geliştirilmelidir (2).

2.1.3. Aflatoksin Azaltma Yöntemleri

Gıda ürünlerindeki aflatoksinleri azaltmak için fiziksel (ısı, ultraviyole ışık, solvent ekstraksiyonu, iyonlaştırıcı radyasyon) ve kimyasal (bazı spesifik asit ve bazların eklenmesi, klorlama, oksidan, hidrolitik ajanlar, indirgeyici ajan, örneğin

sodyum bisülfid) yöntemler kullanılmaktadır (1, 57). Ancak, yüksek maliyetler ve ürünlerde besinsel ve organoleptik kalite eksikliği gibi çeşitli sınırlamaları nedeniyle, bu yöntemler güvenli veya etkili olarak kabul edilmemektedir (14, 58). Öte yandan, aflatoksinlere bağlanabilen mikroorganizmaların kullanımını içeren biyolojik yöntemler, besinlerdeki AFB1 ve AFM1 seviyelerini ve organizmadaki biyoerişilebilirliklerini azaltmak için verimlilikleri, güvenlikleri ve çevre dostu olmaları nedeniyle alternatif ve umut verici bir yöntem olarak kabul edilmektedir (16, 21).

Biyolojik tedaviler arasında, özellikle Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen (GRAS, Generally Recognized As Safe) statüsüne sahip olan laktik asit bakteri türleri yer almaktadır. Laktik asit bakterileri, AFB1 seviyelerini azaltmak için probiyotik olarak kullanılması heyecan verici bir araştırma alanıdır (21). Bu anlamda, çeşitli çalışmalar probiyotik suşların kontamine süt ve tahıl ürünlerinden AFB1'i azaltabileceğini göstermiştir (21, 59, 60).

2.2. Probiyotikler

Yeterli miktarda alındığında, probiyotikler konakçının sağlığını ve beslenmesini olumlu yönde etkileyen canlı mikroorganizmalardır (61). Probiyotikler, süt veya süt ürünü olmayan gıda maddeleri formunda yiyecek veya içeceklere dahil edilerek veya takviye olarak tüketilebilir (62). Sıklıkla kullanılan probiyotik suşlar, çeşitli etkileriyle sağlığı önemli ölçüde etkileyen farklı *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* grubuna aittir (61). Bu iki bakteri grubu GRAS olarak kabul edildiği ve insan bağırsağında baskın bulunan mikroorganizmalar olduğu için daha fazla kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces* ve *Propionibacterium* türleri de sağlığı destekleyici özelliklere sahip oldukları için probiyotik bakteri olarak kullanılmaktadır (63, 64).

Sıklıkla kullanılan probiyotik mikroorganizma türleri Tablo 2.2.'de verilmiştir (2, 13, 65, 66).

Tablo 2.2. Probiyotik mikroorganizma türleri (2, 13, 65, 66)

Probiyotik Cinsi	Türleri
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. johnsonii</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. breve</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. adolescentis</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> ,
<i>Leuconostoc</i>	<i>Lc. lactis</i> , <i>Lc. mesenteroides</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i>
<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i> , <i>B. coagulans</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. thermophilus</i> , <i>S. salivaris</i> , <i>S. oralis</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. boulardii</i> , <i>S. cerevisiae</i>

Besin endüstrisinde genellikle kabul edilen minimum probiyotik bakteri konsantrasyonu 10^6 kob/ml'dir (67). Türk Gıda Kodeksi Etiketleme Yönetmeliği'ne göre de bir ürünün probiyotik ürün olarak tanımlanabilmesi için besinin en az $1,0 \times 10^6$ kob/g canlı probiyotik bakteri içermesi gerekmektedir (68). Probiyotikler faydalı sağlık etkilerini çok çeşitli biyoaktif bileşikleri içeren farklı mekanizmalar yoluyla sağlarlar. Probiyotiklerin etki mekanizmaları arasında pH'ı değiştirerek ve oksijen kullanılabilirliğini azaltarak patojen bakterilerin çoğalmasının rekabetçi bir şekilde engellenmesi, bakteriyosinler üreterek rekabetçi olmayan inhibisyon, vitaminler, amino asitler ve enzimler gibi temel mikro besinlerin sentezi ve diyetle alınan besinlerin biyoyararlanımının artırılması, konakçı bağışıklık sisteminin uyarılması ve karbonhidratların metabolik aktivitesinin artırılması yer almaktadır (69). Geleneksel fermente besinlerde bulunan *Lactobacillus* düşük pH'ya daha dirençlidir ve besinlere daha kolay adapte olabilmektedir. Bu nedenle birçok *Lactobacillus* türlerinin *Bifidobacterium* türlerine kıyasla besin uygulamaları için teknolojik olarak daha uygun olduğu belirtilmektedir (66, 70).

2.3. Prebiyotik: Beta glukan

Prebiyotikler, sindirilemeyen ve kolonda fermente olabilen karbonhidratlardır (19). Tahıl beta glukanı, suda çözünür, prebiyotik ve biyoaktif bir polisakkarit diyet lifidir. Tahıl kaynaklarından elde edilen beta glukanlar, yüksek çözünürlük, viskozite ve bağırsak mikrobiyotası tarafından tamamen fermente edilme eğilimi gibi bir dizi benzersiz işlevsel özelliğe sahiptir (20). Besin endüstrisinde tahıl beta glukanları, stabilizasyon, koyulaştırma, emülsifikasyon ve jelleşme özelliklerinden dolayı içeceklerin, sosların, çorbaların ve diğer besin maddelerinin hazırlanmasında geniş ölçüde kullanılmaktadır (71).

Tahıl beta glukanlarının kolesterol düşürücü etkisi iyi bir şekilde belgelenmiştir (72). Yulaf beta glukanının kolesterol düşürme mekanizması esas olarak bağırsak mikrobiyotası yoluyla kısa zincirli yağ asidi (propiyonat) üretimine dayanmaktadır (73). Beta glukan, antikanser, antidiyabetik, immün modülatör ve anti-inflamatuar özelliklere sahiptir (20). Ayrıca tahıllardan elde edilen beta glukanlar cilt sağlığının desteklenmesinde de faydalıdır; tahıl beta glukanları antioksidan, kırışıklık önleyici, ultraviyole önleyici, yara iyileştirici ve nemlendirici özellikleri sayesinde cildi güçlendirebilir (74).

Ayrıca, *in vitro* yapılan çalışmalarda beta glukanın, *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* suşları tarafından kullanılmasıyla bu mikroorganizmaların canlılığını ve aktivitelerini artırdığı bildirilmiştir (75-78).

2.4. Prebiyotiklerin Aflatoksin Bağlayıcı Özelliği

Prebiyotikler, seçici olarak fermente edilen ve bağırsak mikrobiyotasının bileşimini veya aktivitesini etkileyerek avantaj sağlayan bileşenlerdir (79). Prebiyotiklerin faydaları üzerine yapılan araştırmaların artması sonucunda her geçen gün yeni kullanım alanları geliştirilmekte ve tüketicilerin sağlıklı bir yaşam sürmeleri için mevcut seçenekler iyileştirilmektedir. Prebiyotikler, besinin fiziksel, kimyasal, besinsel ve duyuşsal özelliklerini iyileştirme gibi avantajları nedeniyle besin endüstrisinde geniş bir ürün yelpazesine dahil edilmiştir (80, 81). Ayrıca, prebiyotiklerin antimutajenik ve anti-mikotoksijenik özelliklere de sahip olabileceği öne sürülmüştür (82).

Öte yandan, bazı araştırmacılar probiyotiklerin bağlanma kabiliyetini kimyasal bileşenlerden, özellikle de bir prebiyotik olan beta glukana zincirlerinden oluşan hücre duvarı yapılarına bağlamaktadır (83, 84). Bu durumu destekler nitelikte, Chaharaein ve ark. (85) tavuk sosisi örneklerinde beta glukana en büyük AFB1 azalmasına sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, beta glukana AFB1'i azaltmadaki etkinliğinin inülinde daha yüksek olduğunu göstermişlerdir, bu da beta glukana mükemmel antioksidan aktivitesine ve yapısal özelliklerine bağlanabilir. Ayrıca, birçok çalışma beta glukana ve inülin gibi prebiyotiklerin besinlerde probiyotiklerle birlikte kullanıldığında probiyotik sayısını arttırdığını bildirmiştir (78, 86, 87).

Prebiyotiklerin probiyotiklerle birlikte kullanılmasının belirli koşullar altında aflatoksini azalttığı bildirilmiştir (21, 88, 89). İnülin, Sevim ve ark. (89) tarafından probiyotik bakterilerle (*L. plantarum*, *B. animalis* ve *B. bifidum*) birlikte yoğurttan AFM1'i ortadan kaldırmak için bir prebiyotik olarak kullanılmıştır. On günlük depolamadan sonra, yoğurda eklenen inülin AFM1'in bağlanma kabiliyetinde bir artışa yol açmıştır. Bu nedenle, AFM1'i uzaklaştırmak için inülin kullanmanın başarılı olduğu keşfedilmiştir. Vasconcelos ve ark. (88), *L. plantarum* ile inülin, oligofruktoz, beta glukana ve polidekstroz gibi prebiyotikler kullanarak sütteki AFB1'in azaltılmasını araştırmıştır. AFB1'de en yüksek azalma (%55,85) *L. plantarum* ile birlikte inülin, oligofruktoz ve beta glukana içeren sütte gözlenmiştir. AFB1 biyoerişilebilirliği de *L. plantarum* ile inülin veya oligofruktoz ilavesiyle daha düşük bulunmuştur. Benzer şekilde, Wochner ve ark. (21) beta glukana ve polidekstroz ile birlikte sütteki AFB1 seviyesinde en yüksek düşüşün (%35,53) olduğunu göstermiştir. Prebiyotik eklenen örneklerde aflatoksinin biyoerişilebilirliğinin de daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Prebiyotiklerin probiyotiğin etkisini artırmış ve aflatoksinlerin emilimine karşı bir bariyer oluşturmuş olabileceği düşünülmektedir (21). Prebiyotik türünün yanı sıra, prebiyotik dozu da önemli bir faktördür ve prebiyotiklerin etkisi türe özgü olduğu gibi doza da bağlıdır (90, 91).

2.5. Probiyotiklerin Aflatoksin Bağlayıcı Özelliği

Biyolojik detoksifikasyon, aflatoksinlerin besinlerden uzaklaştırılması için oldukça başarılı bir yöntemdir (92). Gıda güvenliği ile ilgili olarak, bazı araştırmacılar AFB1'i besinlerden uzaklaştırmak için biyolojik yöntemleri kullanmıştır (12, 21, 93).

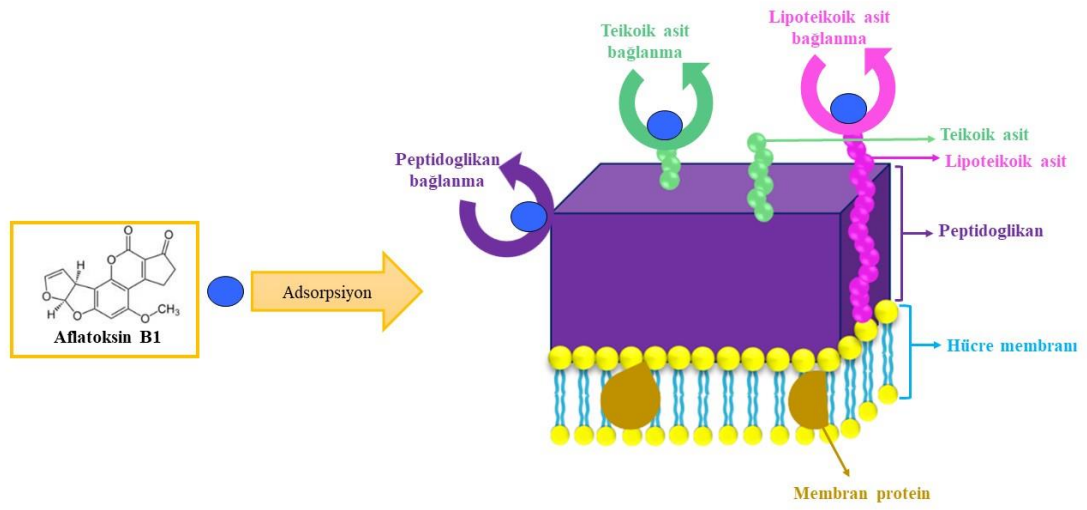
Probiyotik kullanımı, aflatoksinleri azaltma kapasitesi nedeniyle çok ilgi görmüştür. Probiyotikler yenilebilir olduklarından ve güvenli kabul edildiklerinden besinlere bir bileşen olarak eklenebilir. Çeşitli probiyotik bakteriler ve mayalar, özellikle laktik asit bakterileri ve *Saccharomyces* türleri, literatürde AFB1 kontaminasyonunu azaltma kapasiteleri açısından araştırılmıştır (16, 18, 59, 60).

Aflatoksinin bağlanma seviyesi genellikle mikrobiyal suşlardan, mikroorganizma miktarından, aflatoksinin başlangıç konsantrasyonundan, inkübasyon süresinden ve sıcaklıktan etkilenmektedir. Mısır bazlı fermente bir besin olan kwete'de *L. rhamnosus* Yoba 2012 ve *S. thermophilus* C106 kombinasyonu kullanılarak, başlangıçta 40 ng/mL olan AFB1 seviyesinin 30°C'de 24 saat inkübasyon sonrasında %100 oranında azaldığı gözlemlenmiştir (11). Birçok araştırma, besinlerin fermantasyon sürecine dayalı detoksifikasyonu için etkili probiyotik başlatıcılar kullanmaya odaklanmıştır (11, 60, 94). Byakika ve arkadaşları (94) tarafından yapılan bir çalışmada, fermente sorgum-mısır içeceğinde AFB1'i azaltmak için *L. lactis* MNC 24, *W. confusa* MNC 20 ve *L. plantarum* MNC 21 kullanılmıştır. Bu durum, aflatoksin bağlama kapasitesine sahip suşların tahıl bazlı fermente ürünün güvenliğini artırmak için değerlendirilebileceğini göstermektedir. Sütte çeşitli suş türlerinin ve deney düzeneklerinin kullanıldığı birkaç çalışmada, AFM1'deki maksimum düşüşün %100 olduğu da keşfedilmiştir (95-97).

L. rhamnosus, *L. plantarum* ve *S. boulardii* gibi bazı probiyotiklerin kontamine süt örneklerinde AFM1'e bağlanmalarını değerlendirmek için araştırıldığı çalışmada, mikroorganizma suşunun mikroorganizma konsantrasyonundan daha etkili olduğu ve AFM1'deki azalmanın suşa bağlı olduğu sonucuna varılmıştır (96). Benzer şekilde, birçok çalışma da mikroorganizma türünün aflatoksinlerin azaltılmasında çok önemli olduğunu bildirmiştir (18, 98-100). Ayrıca, bazı araştırmacılar, bakteri veya bakteri + maya içeren karışık probiyotik suşların kullanımının besinlerdeki aflatoksin miktarında daha iyi bir düşüş oranı gösterdiğini belirtmiştir (59, 95, 96, 101). Probiyotik bakteri (*B. bifidum*) ve probiyotik maya (*S. cerevisiae* ATCC9763) suşlarının sütte birlikte kullanılmasıyla, AFM1 miktarında %82,8 ile %90 arasında önemli bir azalma gözlemlenmiştir (101).

Probiyotiklerle aflatoksin etkileşimi için önerilen birincil mekanizma, metabolik bozunmadan ziyade yaygın olarak bağlanma olarak bilinen fiziksel

adsorpsiyonu içermektedir. Aflatoksin bağlama kapasitesindeki farklılıklar, probiyotik suşların hücre duvarı yapılarındaki değişikliklere bağlanmıştır. Aflatoksinlerin laktik asit bakterilerine bağlanmasından sorumlu olan bakteri hücre duvarı bileşenleri polisakkaritler, peptidoglikanlar, lipoteikoik asit ve teikoik asittir (21, 88, 102). Ayrıca, AFB1'in hidrojen bağları ve van der Waals etkileşimleri yoluyla bakteri duvarlarında bulunan hücre β -d-glukanlarına bağlanma kabiliyetine sahip olduğu belirtilmiştir (93). AFB1'in laktik asit bakterileri tarafından adsorpsiyonu için potansiyel mekanizması Şekil 2.4.'te gösterilmiştir (103).



Şekil 2.4. AFB1'in laktik asit bakterileri tarafından adsorpsiyonu için potansiyel mekanizmanın şematik gösterimi (103).

Aflatoksin B1 ile kontamine olan besinlerde probiyotikler ve prebiyotikler tarafından AFB1'in azaltılmasına ilişkin yapılan çalışmaların özetleri Tablo 2.3.'te verilmiştir (11, 15, 21, 59, 60, 85, 88, 99, 104).

Tablo 2.3. Aflatoksin B1'in bağlanmasıyla ilgili probiyotikler ve prebiyotikler üzerine yapılan çalışmalar.

Kaynak	Mikroorganizma türü	Mikroorganizma Konsantrasyonu (kob/mL)	Besin Türü	AFB1 Başlangıç Konsantrasyonu	Deney Koşulları (Sıcaklık, Süre)	Analiz Metodu	AFB1 azalma düzeyi (%)	Çalışma Sonuçları
(99)	<i>L. helveticus</i> FAM22155	8.0x10 ⁸	Buğday kepeği	100 µg/mL	37 °C'de 48 saat inkübasyon	ELISA	86,0	AFB1'in en etkili azalması <i>L. helveticus</i> FAM22155 ile gerçekleşmiştir.
	<i>L.delbrueckii subsp. Bulgaricus</i> 2038						17,9	
	<i>L. plantarum</i> 8P-A3						31,6	
	<i>S. thermophilus</i> ATCC19258						21,2	
	<i>L. acidophilus</i> ATCC4356						57,4	
(88)	<i>L. plantarum</i> BG112 + inülin, oligofruktoz ya da beta glukan	10 ⁸ (her bir prebiyotikten %0 ile %0,75 oranında)	Süt	5 µg/L 7,5 µg/L 10 µg/L	37 °C'de 3 ve 6 saat inkübasyon	UHPLC	0–55,85	<i>L. plantarum</i> 'un inülin, oligofruktoz ve beta glukan içeren süte eklenmesi AFB1'de en yüksek azalmayı sağlamıştır.
(11)	<i>L. rhamnosus</i> yoba 2012 <i>S. thermophilus</i> C106	10 ⁸	Kwete (Mısır bazlı fermente besin)	40 ng/mL	30 °C'de 0, 12 ve 24 saat inkübasyon	HPLC	92–100	24 saatlik inkübasyon sonrası AFB1 tespit edilememiştir.

Tablo 2.3. (Devam) Aflatoksin B1'in bağlanmasıyla ilgili probiyotikler ve prebiyotikler üzerine yapılan çalışmalar.

Kaynak	Mikroorganizma türü	Mikroorganizma Konsantrasyonu (kob/mL)	Besin Türü	AFB1 Başlangıç Konsantrasyonu	Deney Koşulları (Sıcaklık, Süre)	Analiz Metodu	AFB1 azalma düzeyi (%)	Çalışma Sonuçları																							
(60)	<i>L. plantarum</i> AF1	4.2 log kob/g	Terxine (Tahıl bazlı bir besin)	0,5µg/kg	37 °C'de 24 saat inkübasyon	HPLC	56,0	<i>L. plantarum</i> AF1 ve LU5 suşlarının ikisi de AFB1'i azaltmıştır. <i>L. plantarum</i> AF1 suşu daha iyi etkinlik göstermiştir.																							
	<i>L. plantarum</i> LU5	4.1 log kob/g					48,0		(15)	<i>L. acidophilus</i> PTCC 1643	10 ⁹	Yoğurt	20 ng/mL	42 °C'de 4 saat inkübasyon ve sonra 1, 11 ve 21 gün 4 °C'de depolama	HPLC	64,56–96,58	21 gün sonra, AFB1 miktarı %64,56 ila %96,58 oranında azalmıştır.	<i>L. rhamnosus</i> PTCC 1637	10 ⁸	(21)	<i>L. acidophilus</i> La-5	(+ %0,75 inülin veya beta gluklan veya polidekstroz)	Süt	3,25 µg/L 6,0 µg/L	37 °C'de 0 ve 6 saat inkübasyon	HPLC	13,5 –35,53	En yüksek bağlanma, en yüksek AFB1 konsantrasyonunda probiyotik ile polidekstroz ve beta gluklan kombinasyonunda bulunmuştur.	(85)	Beta gluklan Inülin	%1: 2, %2: 1, %1,5: 1,5, % 0: 3, %3: 0
(15)	<i>L. acidophilus</i> PTCC 1643	10 ⁹	Yoğurt	20 ng/mL	42 °C'de 4 saat inkübasyon ve sonra 1, 11 ve 21 gün 4 °C'de depolama	HPLC	64,56–96,58	21 gün sonra, AFB1 miktarı %64,56 ila %96,58 oranında azalmıştır.																							
	<i>L. rhamnosus</i> PTCC 1637								10 ⁸	(21)	<i>L. acidophilus</i> La-5	(+ %0,75 inülin veya beta gluklan veya polidekstroz)	Süt	3,25 µg/L 6,0 µg/L	37 °C'de 0 ve 6 saat inkübasyon	HPLC	13,5 –35,53	En yüksek bağlanma, en yüksek AFB1 konsantrasyonunda probiyotik ile polidekstroz ve beta gluklan kombinasyonunda bulunmuştur.	(85)	Beta gluklan Inülin	%1: 2, %2: 1, %1,5: 1,5, % 0: 3, %3: 0	Tavuk sosis	5 µg/kg 10 µg/kg	4 °C'de 1 ve 45 gün	HPLC	16,7–73,7	45 gün sonra, tüm örneklerde AFB1 azalmış ve en önemli azalma 5 µg/kg AFB1 ve %3 beta gluklan içeren örneklerde gözlenmiştir.				
(21)	<i>L. acidophilus</i> La-5	(+ %0,75 inülin veya beta gluklan veya polidekstroz)	Süt	3,25 µg/L 6,0 µg/L	37 °C'de 0 ve 6 saat inkübasyon	HPLC	13,5 –35,53	En yüksek bağlanma, en yüksek AFB1 konsantrasyonunda probiyotik ile polidekstroz ve beta gluklan kombinasyonunda bulunmuştur.																							
(85)	Beta gluklan Inülin	%1: 2, %2: 1, %1,5: 1,5, % 0: 3, %3: 0	Tavuk sosis	5 µg/kg 10 µg/kg	4 °C'de 1 ve 45 gün	HPLC	16,7–73,7	45 gün sonra, tüm örneklerde AFB1 azalmış ve en önemli azalma 5 µg/kg AFB1 ve %3 beta gluklan içeren örneklerde gözlenmiştir.																							

Tablo 2.3. (Devam) Aflatoksin B1'in bağlanmasıyla ilgili probiyotikler ve prebiyotikler üzerine yapılan çalışmalar.

Kaynak	Mikroorganizma türü	Mikroorganizma Konsantrasyonu (kob/mL)	Besin Türü	AFB1 Başlangıç Konsantrasyonu	Deney Koşulları (Sıcaklık, Süre)	Analiz Metodu	AFB1 azalma düzeyi (%)	Çalışma Sonuçları
(104)	<i>L. plantarum</i> EMCC-1039	2x10 ⁸	Süt	50 ng/mL	37 °C'de 24 saat inkübasyon ve sonra 24, 72 ve 196 saat 4 °C'de depolama	HPLC	26,0–85,2	AFB1 konsantrasyonu 24 saatlik bir inkübasyon süresinin ardından tüm suşlar tarafından önemli ölçüde azaltılmıştır. AFB1'in azalması soğuk depolama sırasında da devam etmiş ve <i>L. plantarum</i> AFB1 seviyelerinde en büyük düşüşü göstermiştir.
	<i>L. acidophilus</i> CH-2						52,8–77,6	
	<i>L. rhamnosus</i> B-445						69,0–79,4	
	<i>S. thermophilus</i> CH-1						55,7–65,2	
(59)	<i>S. thermophilus</i> DSM 20259	1x10 ⁹ 3x10 ⁹ 5x10 ⁹	Bebek mamaları (Cerelac)	50 ng/mL	37 °C'de 12, 24, 48 ve 72 saat inkübasyon	HPLC	48,24–90,8	Probiyotik bakteri ve maya kombinasyonunun kullanılması, besinlerdeki aflatoksinlerin azaltılması ve/veya ortadan kaldırılması için etkili bir yöntem olabilir.
	<i>B. bifidum</i> DSM 20082							
	<i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 2359							
	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 64712							

2.6. Aflatoksin B1 Biyoerişilebilirliği ile ilgili *In Vitro* Sindirim Çalışmaları

İnsanlar, kontamine besinlerin tüketimi ile günlük olarak nanogramdan mikrograma kadar aflatoksinlere maruz kalabilmektedir. Bununla birlikte, belirli bir doku veya organ üzerinde herhangi bir zararlı etki oluşabilmesi için, aflatoksinlerin bu dokulara ulaşması gerekmektedir. Bu durum, bileşiklerin gıda matrisinden serbest bırakılmasını ve ardından bağırsak hücreleri aracılığıyla emilmesini gerektirmektedir. Biyoerişilebilirlik, bir bileşiğin gıda matrisinden gastrointestinal sistemde serbest bırakılarak bağırsak emilimine uygun hale gelen kısmı olarak tanımlanmıştır (22, 23). *In vitro* sindirim yöntemi, laboratuvarında insan sindirim sistemini taklit ederek gıdaların gastrointestinal davranışlarını incelemek amacıyla kullanılmaktadır. İnsan beslenme çalışmaları altın standart kabul edilse de *in vitro* modeller hızlı, ucuz, etik açıdan kısıtlama olmadığı için daha çok tercih edilmektedir. Ayrıca, *in vitro* sindirim modelinin koşulların kontrollü olması, kolay örneklem seçimi ve tekrarlanabilirlik gibi avantajları da bulunmaktadır (105).

Hollanda'da bulunan Ulusal Halk Sağlığı ve Çevre Enstitüsü (RIVM, Bilthoven), besinlerde bulunan kontaminantların biyoerişilebilirliğini incelemek amacıyla bir *in vitro* sindirim modeli geliştirmiştir (22). Geliştirilen sindirim modeli, 37°C'de 5 dakika süren ağız sindirimi ile başlayarak, 2 saatlik mide sindirimi ve ardından 2 saatlik ince bağırsak sindirimi ile devam etmektedir. Aflatoksin B1'in biyoerişilebilirliği ilk kez 2005 yılında Versantvoort ve ark. tarafından geliştirilen *in vitro* sindirim modeli ile gerçekleştirilmiş ve AFB1 biyoerişilebilirliği ortalama %94 oranında tespit edilmiştir. Aflatoksinlerin gıda matrisinden nerdeyse tamamen salındığı sonucuna varılmıştır (22).

Aflatoksin B1'in probiyotik bakterilerle birlikte biyoerişilebilirliği de ilk kez 2009 yılında Kabak ve ark. (106) tarafından bu *in vitro* sindirim modeli kullanılarak belirlenmiştir. Antep fıstığındaki AFB1'in biyoerişilebilirliği %86 oranında belirlenirken, probiyotik bakterilerin kullanılmasıyla AFB1 biyoerişilebilirliğinde %37'lik bir azalma tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Kabak ve Özbey (23) 2012 yılında yaptıkları çalışma da AFB1 biyoerişilebilirliğini farklı gıda matrislerini kullanarak %85,1 ile %98,1 arasında tespit ederken, çeşitli probiyotik bakteriler kullanarak AFB1 biyoerişilebilirliğinin %18,1 ile %35,6 oranında azaldığını bildirmiştir.

Aflatoksin B1 biyoerişilebilirliği ile ilgili *in vitro* sindirim çalışmaları Tablo 2.4.'te verilmiştir (16, 21, 23, 88). Aflatoksin B1 biyoerişilebilirliği üzerine probiyotik ve prebiyotik gibi biyolojik ajanların etkisini araştıran çalışmaların sınırlı olduğu görülmekle birlikte bu çalışmalarda genellikle ince bağırsaktaki etkileri incelenmiştir. Ancak aflatoksin-biyolojik ajan kompleksinin kolona emilmeden ulaşarak burada mikroorganizma ve enzim faaliyetleriyle etkileşime girebileceği düşünüldüğünde, bu kompleksin gastrointestinal sistem boyunca kararlılığı ve etkilerinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Aflatoksin B1 biyoerişilebilirliğinin azaltılması için farklı biyolojik ajanların değerlendirilmesi ve yeni yaklaşımların geliştirilmesi gerekmektedir.



Tablo 2.4. Aflatoksin B1 biyoerişilebilirliği ile ilgili *in vitro* sindirim çalışmaları

Kaynak	Mikroorganizma türü	Mikroorganizma Konsantrasyonu (kob/mL)	Besin Türü	AFB1 Başlangıç Konsantrasyonu	Analiz Metodu	AFB1 Biyoerişilebilirliğindeki azalma düzeyi (%)	Çalışma Sonuçları
(88)	<i>L. plantarum</i> BG112 + inülin, oligofruktoz veya beta gluklan	10 ⁸ (her bir prebiyotikten %0 ile %0,75 oranında)	Süt	5 µg/L 7,5 µg/L 10 µg/L	UHPLC	15,62 – 51,09	Probiyotikle birlikte inülin veya oligofruktoz ayrı ayrı eklendiğinde, biyoerişilebilirliğin en düşük olduğu bulunmuştur.
(23)	<i>B. longum</i> <i>B. species 420</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. acidophilus NCFM150B</i> <i>L. casei Shirota</i>	10 ⁸	Yer fıstığı, Antep fıstığı, Fındık, Kuru incir, Kırmızı biber, Buğday ve Mısır	2 µg/kg 5 µg/kg 10 µg/kg	HPLC	18,1 – 35,6	Probiyotik bakterilerin her bir besin matrisine eklenmesi, AFB1'in biyoerişilebilirliğinde önemli bir azalma ile sonuçlanmıştır.
(21)	<i>L. acidophilus</i> La-5	10 ⁸ (+ %0,75 inulin veya beta gluklan veya polidekstroz)	Süt	3,25 µg/L 6,0 µg/L	HPLC	13,53 – 35,53	<i>L. acidophilus</i> , tüm gruplarda aflatoksinlerin biyoerişilebilirliğinde bir azalma göstermiştir.
(16)	<i>L. acidophilus</i> PTCC 1643 <i>L. rhamnosus</i> PTCC 1637	10 ⁹	Süt	5 µg/mL	HPLC	28,34 – 43,5 24,32 – 40,58	<i>L. acidophilus</i> ve <i>L. casei</i> AFB1 biyoerişilebilirliğinde azalma göstermiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Ocak-Eylül 2023 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Laboratuvarı ve Hacettepe Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü'ne ait Organik Materyal Laboratuvarı ve Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Gereç

Bağlanma yeteneklerini araştırmak için probiyotik bakteri ve maya kullanılmıştır. Probiyotik bakteri olarak *Lactobacillus leichmannii* (ATCC 10697) (*Lactobacillus lactis*'in eş anlamlısı) RSKK 06048 suşu ve probiyotik maya olarak *Saccharomyces boulardii* RSKK 06047 yerli suşu Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı'ndan alınmıştır. Kullanılan suşların literatürde önceden çalışılmamış olmasına dikkat edilmiştir.

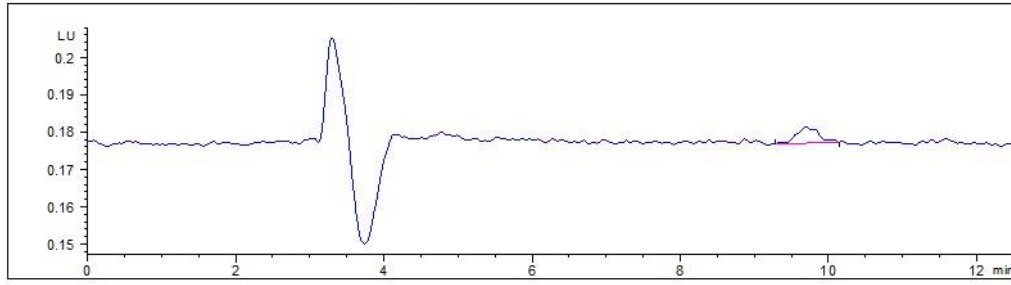
L. leichmannii (ATCC 10697) RSKK 06048 suşu için MRS agar (Biokar) ve *S. boulardii* RSKK 06047 suşu için YPD agar (Condalab) kullanılarak çoğaltılma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Aflatoxin B1 standardı, 10 mL asetonitril içerisinde 25 µg/mL (TRILOGY TAS-M11LA1-10) olarak vida kapaklı şişede temin edilmiştir. Hazırlanan örneklerde AFB1'i bağlama yeteneğinin belirlenmesi için AFB1'e özgü antikorları içeren bir AFB1 immunoaffinity kolonu (R-Biopharm Aflaprep P07) tercih edilmiştir.

Test parametrelerinin inkübasyon ve *in vitro* sindirim sonrası AFB1'i bağlama yeteneği HPLC ile belirlenmiştir. Tüm analiz aşamalarında kullanılan kimyasallar HPLC saflığındadır.

Boza yapımında kullanılan bulgur, mısır unu ve buğday unu yerel bir boza firmasından temin edilmiştir. Hazırlanan bozanın AFB1 içeriği ölçüm limitinin altında bulunmuştur. Ayrıca Şekil 3.1.'de bozaya ait HPLC kromatogramı gösterilmiştir.

Çalışmada prebiyotik olarak kullanılan beta glukan Aksuvital Doğal Ürünler Gıda Sanayi Ticaret Limited Şirketi tarafından temin edilmiştir. Beta glukan arpa ve yulaftan elde edilmiş ve %70'den fazla beta glukan içeren endüstriyel bir üründür.



Şekil 3.1. Bozaya ait HPLC kromatogramı.

Probiyotik maya ve bakterinin yoğunluğunu ayarlamak için Fosfat Tamponlu Tuzlu Su (PBS; Sigma-Aldrich P4417) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Boza Örneklerinin Hazırlanması

Boza örneklerini hazırlamak için, 1500 mL su mezür ile ölçüldükten sonra tencereye konulup kaynatıldı. Bulgur (80 g), mısır unu (25 g) ve buğday unu (25 g) tartıldı. Kaynayan suyun içerisine önce bulgur eklenip 1 saat boyunca ara ara karıştırılarak kaynatıldı. Daha sonra unlar ve 1500 mL daha su eklenerek yarım saat daha kaynatıldı. Ocağı kapattıktan sonra ara ara karıştırılarak soğumaya bırakıldı. Soğuduktan sonra ince delikli bir süzgeç yardımıyla süzüldü ardından temiz beyaz bir tülbent yardımı ile ikinci kez süzme işlemi yapıldı. Süzüldükten sonra çalışma örneklerinin hazırlanması için boza falkonlara konuldu.

3.2.2. Aflatoksin B1 Standart Çözeltisinin Hazırlanması

Aflatoksin B1 standardı (10 mL asetonitril içerisinde 25 µg/ml konsantrasyonda AFB1) asetonitril ile seyreltilerek 1 µg/mL 50 mL'lik AFB1 stok çözelti oluşturulmuştur. Stok çözelti hazırlandıktan sonra alüminyum folyo ile sarılarak ışıktan korunması sağlanmıştır.

3.2.3. Liyofilize Maya ve Bakteri Kültürünün Hazırlanması

S. boulardii RSKK 06047 ve *L. leichmannii* (ATCC 10697) RSKK 06048 liyofilize kültürlerini içeren cam tüplerin uç kısmı yaklaşık 1-2 cm içeriden keskin bir eğe çentiklendi. Ardından, tüpler alkolle ıslatılmış bir gazlı bezle dezenfekte edildi ve çentiklenmiş bölgeden kırıldı.

Cam ampullerdeki liyofilize bakteri kültürüne 1 mL MRS broth, liyofilize maya içeren cam ampule ise 1 mL Brain Heart İnfüzyon eklenerek çözünmesi için bir iki dakika beklenildi.

L. leichmannii MRS agar ortamına ekildi ve 48-72 saat mikroaerofilik koşullarda 37°C'de inkübe edildikten sonra tekrarlayan pasajlar gerçekleştirildi.

S. boulardii ise YPD agar ortamına ekildi ve 24 saat 37 °C'de inkübe edildikten sonra tekrarlayan pasajlar yapıldı.

Çalışma grupları oluşturulurken içerisine eklenecek bakteri (2×10^8 kob/mL) ve maya (2×10^6 kob/mL) miktarları PBS çözeltisi içerisinde McFarland densitometresi kullanılarak ayarlandı.

3.2.4. Aflatoksin B1 ile Kontamine Edilmiş Boza Örneklerinin Hazırlanması

Aflatoksin B1 çalışma çözeltisi 100 ng/mL konsantrasyonunda hazırlandıktan sonra, içerisindeki asetonitril azot (N₂) gazı ile uzaklaştırıldı.

Hazırlanan boza 37°C'ye ısıtılıp önceden hazırlanan kuru AFB1 ile birleştirilerek AFB1 ile kontamine edilmiş boza örnekleri hazırlandı. AFB1 ile kontamine olan boza örnekleri test edilecek bakteri, maya ve beta glukan (%1,5) ile birleştirildi ve Şekil 3.2.'de belirtilen çalışma grupları oluşturuldu. Eklenen probiyotik mikroorganizmaların miktarı Türk Gıda Kodeksi Beslenme ve Sağlık Beyanı Yönetmeliği'nde bir ürünün probiyotik olabilmesi için içermesi gereken minimum probiyotik mikroorganizma miktarı 1×10^6 kob/mL göz önünde bulundurularak belirlendi (107). Maya yapısına göre bakterinin yapısı daha küçük olduğundan, 10^6 kob/mL maya ile ölçülen yoğunluk bakteri miktarı 10^8 kob/mL olduğunda ölçülmektedir. Örneklerde bulunan mikroorganizma yoğunluklarının eşit olabilmesi için olası kayıplar da dikkate alınarak maya ve bakteri miktarları sırasıyla 2×10^6 kob/mL ve 2×10^8 kob/mL olarak ayarlanmıştır. Eklenen beta glukan miktarı da yapılan

çalışmalarda beta glukanın prebiyotik etkisini gösterebilecek günlük alım miktarına uygun olarak belirlendi (75, 77).

Tüm örnekler üç tekrarlı hazırlandı. İnkübasyon ve *in vitro* sindirim (mide, ince bağırsak, kolon) sonrası çalışma örneklerinde AFB1 analizi yapmak için her çalışma grubundan 12 adet hazırlanarak toplamda 108 örnek oluşturuldu. Örnekler 30°C'de 24 saat boyunca inkübe edildi. Çalışma gruplarındaki AFB1'in bağlanma düzeylerini belirlemek için inkübasyon sonrasında örnekler 15 dakika 3000xg de santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant içerisindeki serbest AFB1 miktarı da HPLC analizi kullanılarak belirlendi.

Örnek ismi	Örnek içeriği
Pozitif kontrol	Sadece AFB1 kontamine boza
Negatif kontrol	AFB1 olmayan, mikroorganizma içeren boza
Test grubu 1	AFB1 kontamine boza + 10 ⁸ kob/mL <i>Lactobacillus leichmannii</i>
Test grubu 2	AFB1 kontamine boza + 10 ⁶ kob/mL <i>Saccharomyces boulardii</i>
Test grubu 3	AFB1 kontamine boza + 10 ⁸ kob/mL <i>Lactobacillus leichmannii</i> + 10 ⁶ kob/mL <i>Saccharomyces boulardii</i>
Test grubu 4	AFB1 kontamine boza + Beta glukun
Test grubu 5	AFB1 kontamine boza + 10 ⁸ kob/mL <i>Lactobacillus leichmannii</i> + Beta glukun
Test grubu 6	AFB1 kontamine boza + 10 ⁶ kob/mL <i>Saccharomyces boulardii</i> + Beta glukun
Test grubu 7	AFB1 kontamine boza + 10 ⁸ kob/mL <i>Lactobacillus leichmannii</i> + 10 ⁶ kob/mL <i>Saccharomyces boulardii</i> + Beta glukun

Şekil 3.2. Boza örneklerinin çalışma grupları.

Elde edilen sonuçlara göre, AFB1'in bağlanma yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

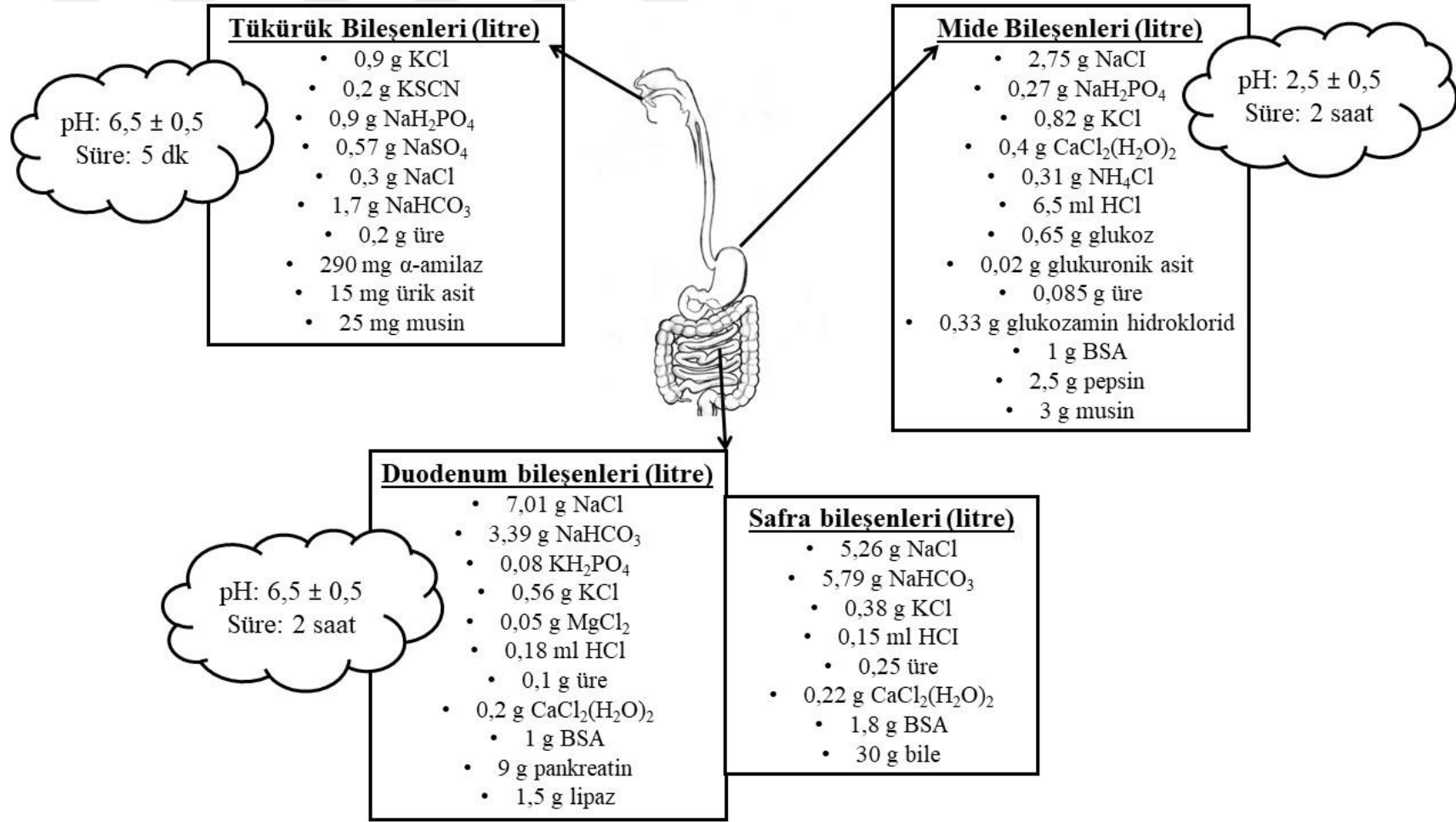
$$\text{AFB1 Bağlanma yüzdesi} = \left(1 - \frac{\text{Örnekteki AFB1 pikinin alanı}}{\text{AFB1 kontrol pikinin alanı}} \right) * 100$$

Test gruplarının AFB1 biyoerişilebilirliği üzerine etkisini incelemek için, hazırlanan örnekler inkübasyon sonrası laboratuvar ortamında geliştirilen *in vitro* sindirim modeli ile gastrointestinal sindirime tabi tutulmuştur.

3.2.5. AFB1 Biyoerişilebilirliği için *İn Vitro* Sindirim Modelinin Uygulanması

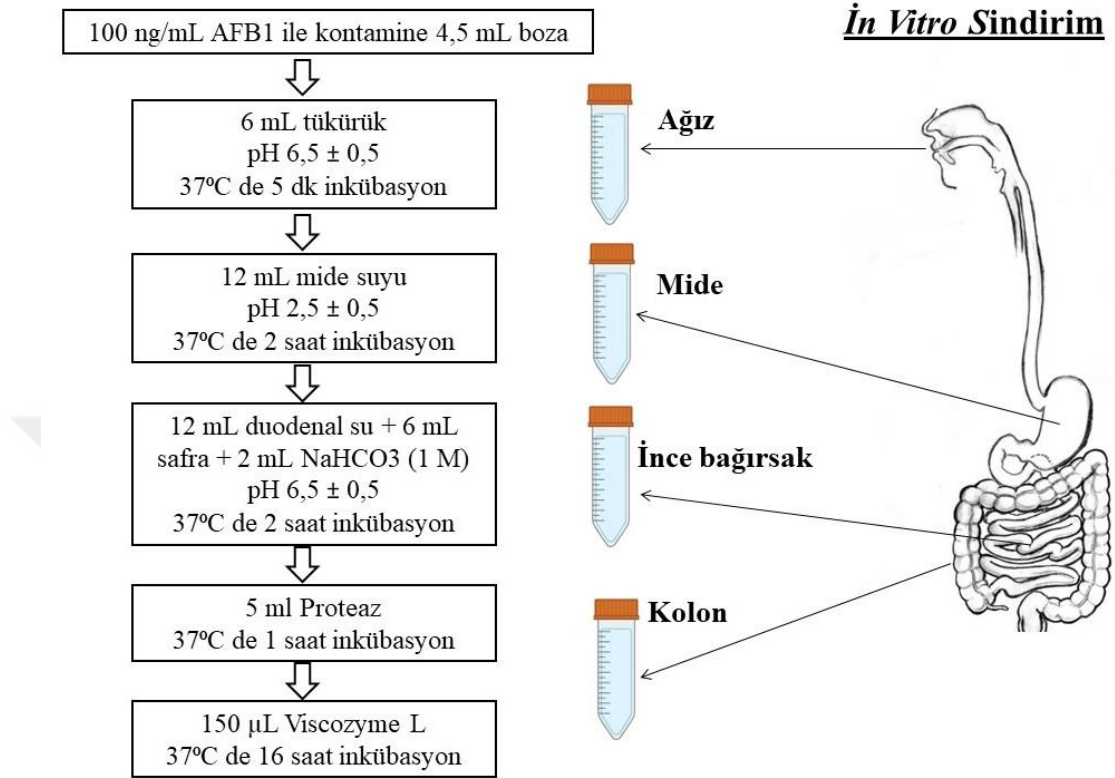
Tüm örneklere inkübasyon sonrası *in vitro* sindirim modeli uygulanmıştır. Hollanda Ulusal Halk Sağlığı ve Çevre Enstitüsü'nün geliştirdiği *in vitro* sindirim modeli kullanılarak laboratuvar ortamında gastrointestinal sindirim taklidi yapılmıştır (22). Kullanılan *in vitro* sindirim modelinde, ağızdaki sindirim 37°C'de 5 dakika süren bir simulasyonla başlayıp, ardından 2 saat boyunca mide simülasyonuna geçer ve en sonunda ince bağırsak simülasyonu 2 saatte tamamlanmaktadır. Kullanılan *in vitro* sindirim modelinde ağız, mide ve ince bağırsaktaki bileşenler Şekil 3.3.'te gösterilmiştir.

Ayrıca bu çalışmada, kolon simülasyonu için bağırsak florasında bulunan bakteriyel enzimlerden yararlanılmıştır. İnce bağırsak sindirimi sonrası örnekler, *Streptomyces grise* türünden elde edilen bir proteaz enzimi solüsyonu (Sigma P5147) eklenerek 37°C'de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra, arka bağırsak mikrobiyal fermentasyonunu taklit etmek için Viscozyme L (Sigma V2010) adlı mikrobiyal enzim eklenmiş ve 37°C'de 16 saat boyunca inkübe edilmiştir (108).



Şekil 3.3. Uygulanan *in vitro* sindirim bileşenleri.

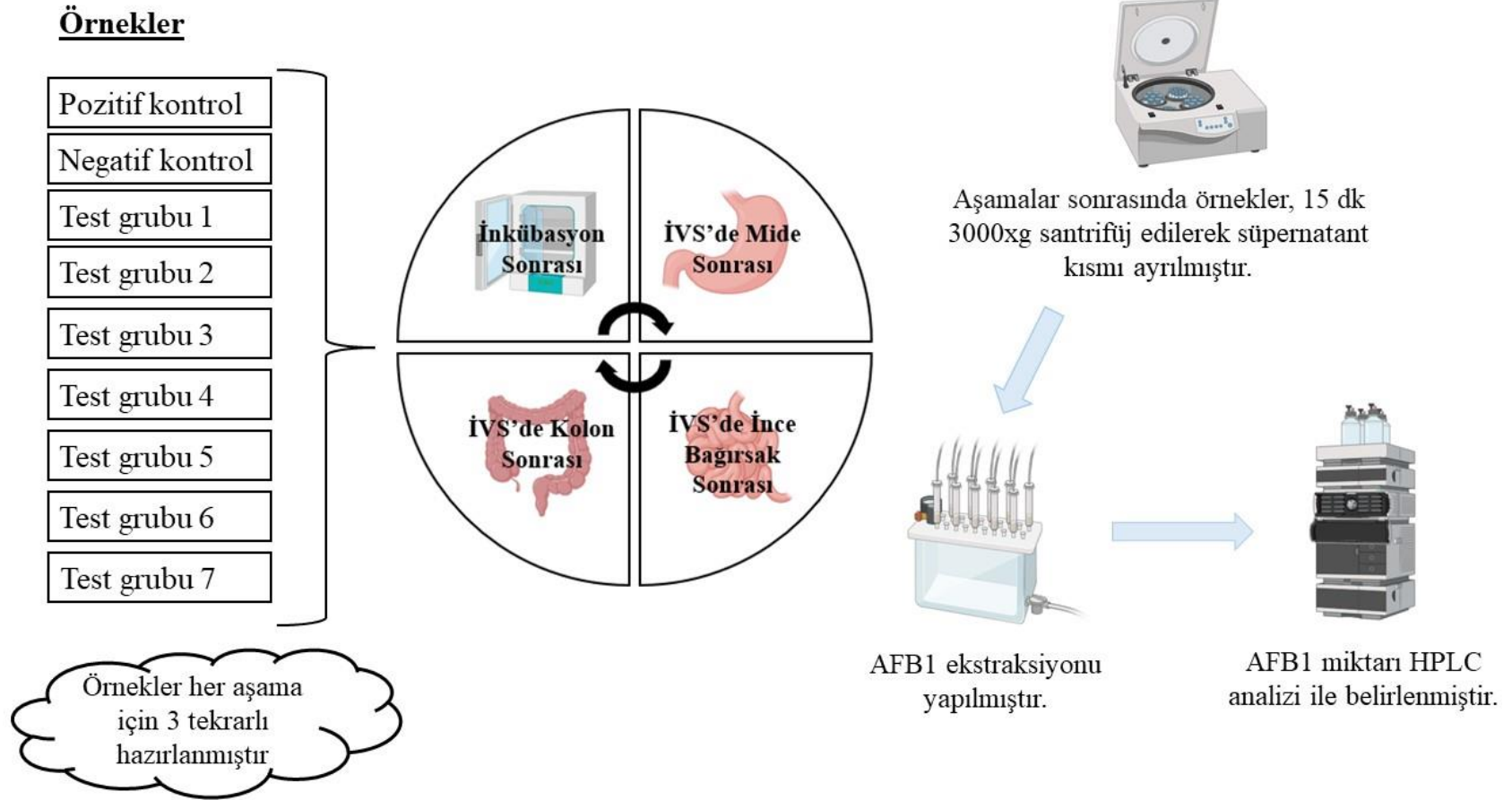
Kullanılan *in vitro* sindirim modelinin uygulama aşamaları da Şekil 3.4.'te gösterilmiştir.



Şekil 3.4. *In vitro* sindirim modelinin uygulama aşamaları.

Kullanılan sindirim modelinde mide, ince bağırsak ve kolon aşamalarından sonra serbest AFB1 miktarının tespiti ayrı ayrı yapılmıştır. Mide, ince bağırsak ve kolon aşamalarından sonra örnekler, 15 dakika 3000xg santrifüj edilip süpernatant kısmı ayrılmıştır. Süpernatant içerisinde bulunan serbest AFB1 miktarı AFB1 ekstraksiyonu sonrası HPLC analizi ile belirlenmiş ve şekilsel olarak Şekil 3.5.'te gösterilmiştir. Aflatoksin B1'in biyoerişilebilirliği aşağıda bulunan formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{AFB1 Biyoerişilebilirlik yüzdesi} = \left(\frac{\text{İn vitro sindirilmiş örnekteki AFB1 miktarı}}{\text{Sindirim öncesi AFB1 miktarı}} \right) * 100$$



Şekil 3.5. Örneklerin analiz aşamaları.

3.2.6. Aflatoksin B1 Analizi

AFB1 ekstraksiyonu

Tüm örnekler, inkübasyon süreci ve mide, ince bağırsak, kolon sindirim aşamalarını tamamladıktan sonra, 15 dakika 3000xg santrifüj edilerek süpernatant ayrıldı ve süpernatant içerisinde bulunan serbest AFB1, AFB1'e ait immünoafinite kolon (R-Biopharm; Almanya) kullanılarak vakum manifoldunda ekstrakte edildi. Ekstraksiyon sonrasında elde edilen örnekler bir vialde toplandı, ardından alüminyum folyo ile sarılarak HPLC analizine kadar ışık almayacak şekilde -20°C'de saklandı. Vakum manifoldu kullanılarak yapılan AFB1 ekstraksiyonu Şekil 3.6.'da gösterilmiştir.



Şekil 3.6. Aflatoksin B1'e özgü immünoafinite kolon kullanarak vakum manifoldunda AFB1'in ekstraksiyonu.

HPLC analizi

Boza örneklerinin AFB1 analizlerinde AOAC metodundan yararlanılmıştır. Elde edilen örneklerdeki AFB1 miktarları floresans dedektörlü HPLC cihazı ile yapılmıştır. Analiz için C18 kolonu (5m, 250x4.6 mm) kullanılmıştır. Ultra Saf Su/Metanol/Asetonitril (6:3:2 v/v/v)'den oluşan bir mobil faz hazırlanmıştır. Mobil faz çözeltisinin içerisinde litresinde 132 mg Potasyum bromür (KBr) ve 110 µL %65'lik

Nitrik asit (HNO₃) ilave edilmiştir. Hazırlanan mobil faz çözeltisi 0,45 mikron filtre kâğıdından süzildükten sonra kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 25°C'ye, eksitasyon dalga boyu 360 nm'ye, emisyon dalga boyu 440 nm'ye ve pompa akış hızı 1 mL/dakika'ya ayarlanmıştır. Tüm ayarlamaların tamamlanmasının ardından, her örnekten yalnızca bir kez 100 µL enjekte edilerek HPLC analizi gerçekleştirilmiş ve sonuçlar elde edilmiştir.

Metot validasyonu

Metot validasyonu amacıyla standart ilave metodu kullanılarak AFB1 geri kazanım miktarları belirlenmiştir. Bunun için ekstraksiyon öncesinde örneğe belirli konsantrasyonlarda (25, 50 ve 100 ng/mL) AFB1 stok solüsyonu eklenmiştir. Geri kazanım oranı AFB1 için ortalama %99,69 olarak tespit edilmiştir. Çalışmada analiz edilen AFB1'in standart solüsyonlarının kalibrasyon eğrisi ile hesaplanan RSD (Relative Standard Deviation), LOD (Limit of detection) ve LOQ (Limit of quantification) değerleri Tablo 3.1.'de belirtilmiştir.

Tablo 3.1. AFB1 geri kazanım, LOD, LOQ ve RSD değerleri (n = 3)

	Konsantrasyon (ng/mL)	Geri Kazanım (%)	RSD (%)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	R ²
AFB1	25	99.27	2.72	0.1	0.3	0.9982
	50	101.19	1.30			
	100	98.62	2.35			

LOD: Limit of Detection (Tayin Limiti); LOQ: Limit of Quantification (Ölçüm Limiti); RSD %: Relative Standard Deviation (Bağıl Standart Sapma).

3.2.7. İstatistiksel Değerlendirme

Aflatoksin B1'in bağlanma yeteneklerini ve biyoerişilebilirlik düzeylerini belirlemek için tüm veriler, SPSS 22 programı kullanılarak istatistiksel analiz yapılmıştır. Analizler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma gruplarının inkübasyon ve *in vitro* sindirim (mide, ince bağırsak ve kolon) sonrası biyoerişilebilirlik ve bağlanma düzeylerindeki farklılıklar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak değerlendirilmiştir. Gruplar arasındaki anlamlı farklar ise Post-Hoc Tukey testi ile incelenmiştir. İstatistiksel anlamlılık seviyesi p<0,05 olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Bozada Probiyotik Maya, Bakteri ve Beta Glukanın İnkübasyon Sonrası Aflatoksin B1 Bağlanma Düzeyleri

Çalışma gruplarında tespit edilen AFB1 bağlanma kapasitesi ortalama %12,73±1,51 ile %27,79±1,95 arasında bulunmuştur. Aflatoksin B1 bağlama kapasitesi *S. boulardii* bulunan test grubu 2 örneklerinde en yüksek olarak görülürken, en düşük AFB1 bağlama kapasitesi *L. leichmannii* + *S. boulardii* + Beta glukan bulunan test grubu 7 örneklerinde saptanmıştır. İki test grubu arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

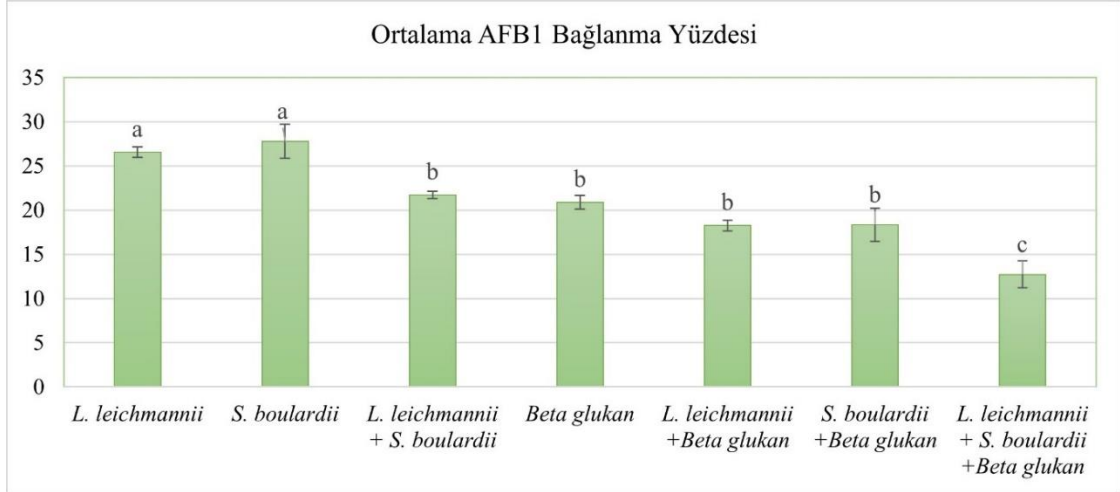
Bozada, test parametrelerinin AFB1'e bağlanma düzeylerine ilişkin detaylar Tablo 4.1'de belirtilmiştir.

Tablo 4.1. İnkübasyon sonrası probiyotik bakteri ve maya ile beta glukanın bozada AFB1 bağlanma düzeyleri

Test grupları	Test parametreleri	Bağlanma düzeyi (%)
1. grup	<i>L. leichmannii</i>	26,54±0,59 ^a
2. grup	<i>S. boulardii</i>	27,79±1,95 ^a
3. grup	<i>L. leichmannii</i> + <i>S. boulardii</i>	21,72±0,41 ^b
4. grup	Beta glukan	20,89±0,78 ^b
5. grup	<i>L. leichmannii</i> +Beta glukan	18,27±0,61 ^b
6. grup	<i>S. boulardii</i> +Beta glukan	18,35±1,89 ^b
7. grup	<i>L. leichmannii</i> + <i>S. boulardii</i> +Beta glukan	12,73±1,51 ^c
p		<0,001

Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde sunulmuştur. p değeri ANOVA yöntemi ile hesaplanmıştır. Aynı sütunda farklı harflerle belirtilen değerler, Post-Hoc Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

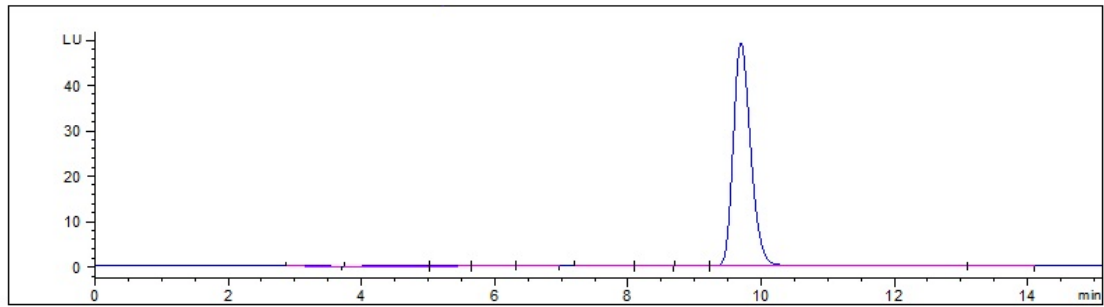
Boza örneklerinde test parametrelerine ait AFB1 bağlanma seviyeleri Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.



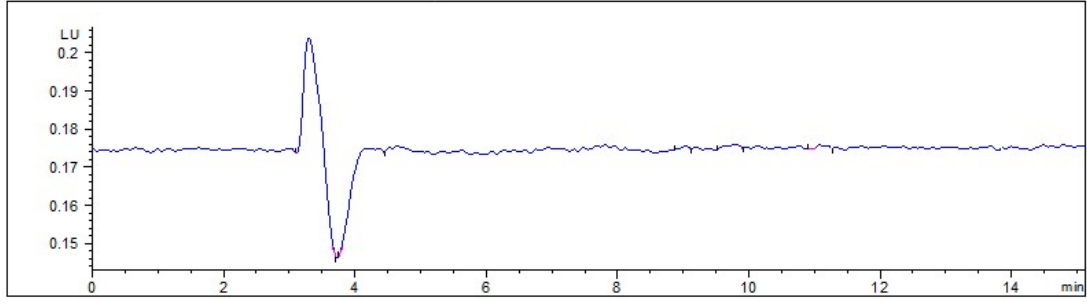
Şekil 4.1. İnkübasyon sonrası probiyotik bakteri ve maya ile beta glukunun bozada AFB1'ebağlanma seviyeleri.

Post-Hoc Tukey testine göre, farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları ($p < 0,05$), aynı harfler ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığını göstermektedir.

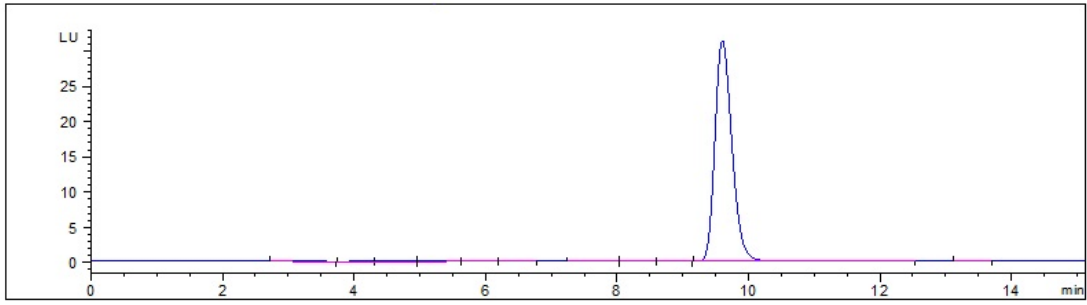
Pozitif kontrol örneklerindeki AFB1 düzeyinin HPLC kromatogramı Şekil 4.2.'de, negatif kontrol örneklerindeki AFB1 düzeyinin HPLC kromatogramı Şekil 4.3.'te, *S. boulardii* içeren örneklerdeki AFB1 düzeyinin HPLC kromatogramı Şekil 4.4.'te ve *L. leichmannii* + *S. boulardii* + Beta glukun içeren örneklerdeki AFB1 düzeyinin HPLC kromatogramı ise Şekil 4.5.'te gösterilmiştir.



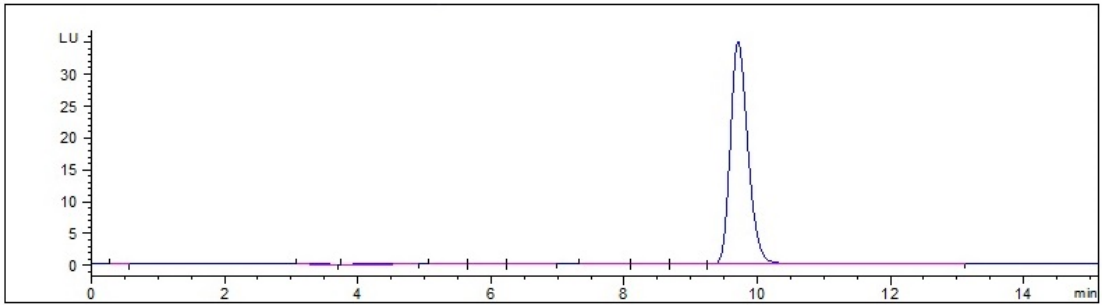
Şekil 4.2. İnkübasyon sonrasında pozitif kontrol örneklerindeki AFB1 düzeyinin HPLC kromatogramı.



Şekil 4.3. İnkübasyon sonrasında negatif kontrol örneklerindeki AFB1 düzeyinin HPLC kromatogramı.



Şekil 4.4. İnkübasyon sonrasında *S. boulardii*'nin bulunan örneklerdeki AFB1 düzeyinin HPLC kromatogramı.



Şekil 4.5. İnkübasyon sonrasında *L. leichmannii* + *S. boulardii* + Beta glukanın bulunan örneklerdeki AFB1 düzeyinin HPLC kromatogramı.

4.2. Probiyotik Maya ve Bakteri ile Beta Glukanın Bozada AFB1 Biyoerişilebilirliği Üzerine Etkisi

Bozada AFB1'in biyoerişilebilirliği, sırasıyla mide sonrasında %92,46±0,82, ince bağırsak sonrasında %87,80±2,60 ve kolon sonrasında %78,08±0,26 olarak tespit edilmiştir.

4.2.1. Probiyotik Maya ve Bakteri ile Beta Glukanın Mide Sonrası Bozada AFB1 Biyoerişilebilirliği Üzerine Etkisi

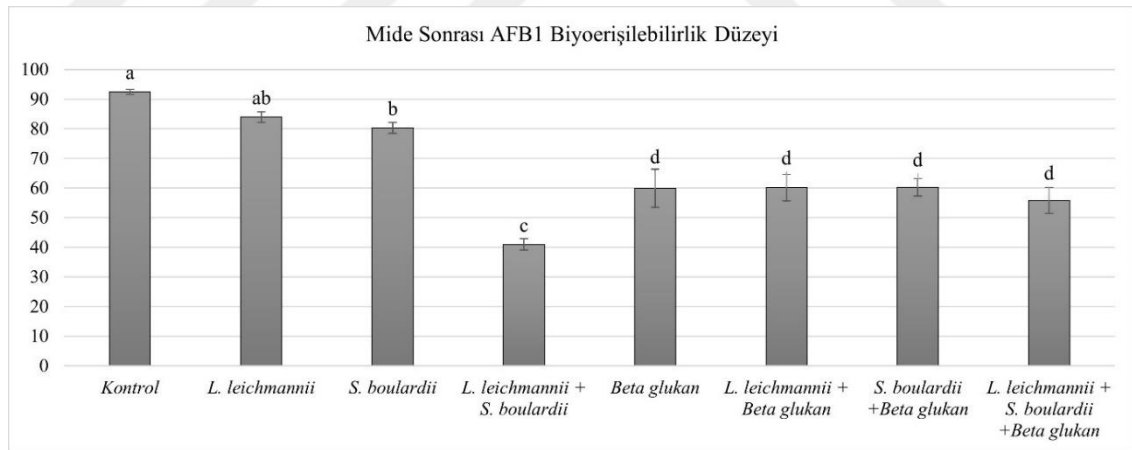
In vitro sindirim modeli uygulanan örneklerde, mide aşamasından sonra en düşük AFB1 biyoerişilebilirlik düzeyi %40,90±1,92 ile *L. leichmannii* + *S. boulardii* içeren 3. test grubunda tespit edilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p<0,001$). Benzer şekilde *S. boulardii* bulunan 2. test grubundaki AFB1 biyoerişilebilirlik düzeyi (%80,28±1,88) de kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma sağlamıştır ($p<0,001$). Beta glukanın ve beta glukan ile birlikte mikroorganizmaların da eklendiği 4., 5., 6. ve 7. test gruplarında da AFB1 biyoerişilebilirlik düzeyleri %55,77±4,38 ile %60,23±2,97 arasında tespit edilerek pozitif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş sağladığı görülmektedir ($p<0,05$). Diğer taraftan *L. leichmannii* bulunan 1. test grubunda ise AFB1 biyoerişilebilirliği kontrol grubuna göre azalmıştır (%83,95±1,80). Ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

In vitro sindirim modeli kullanılarak bozada mide sonrası belirlenen AFB1 biyoerişilebilirlik düzeyleri Tablo 4.2.'de sunulmuş ve Şekil 4.6.'da gösterilmiştir.

Tablo 4.2. *In vitro* sindirim modeli kullanılarak bozada mide sonrası ölçülen AFB1 biyoerişilebilirlik seviyeleri

Test grupları		Mide Sonrası Biyoerişilebilirlik (%)
Pozitif kontrol	Kontrol	92,46±0,82 ^a
1. grup	<i>L. leichmannii</i>	83,95±1,80 ^{ab}
2. grup	<i>S. boulardii</i>	80,28±1,88 ^b
3. grup	<i>L. leichmannii</i> + <i>S. boulardii</i>	40,90±1,92 ^c
4. grup	Beta glukan	59,86±6,42 ^d
5. grup	<i>L. leichmannii</i> + Beta glukan	60,14±4,48 ^d
6. grup	<i>S. boulardii</i> +Beta glukan	60,23±2,97 ^d
7. grup	<i>L. leichmannii</i> + <i>S. boulardii</i> +Beta glukan	55,77±4,38 ^d
p		<0,001

Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde sunulmuştur. p değeri ANOVA yöntemi ile hesaplanmıştır. Aynı sütunda farklı harflerle belirtilen değerler, Post-Hoc Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir (p<0,05).



Şekil 4.6. Çalışma gruplarında *in vitro* sindirim modeli kullanılarak mide sonrası bozada ölçülen AFB1 biyoerişilebilirlik seviyeleri

Post-Hoc Tukey testine göre, farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları (p<0,05), aynı harfler ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığını göstermektedir.

4.2.2. Probiyotik Maya ve Bakteri ile Beta Glukanın İnce Bağırsak Sonrası Bozada AFB1 Biyoerişilebilirliği Üzerine Etkisi

İnce bağırsak sonrası AFB1 biyoerişilebilirlik düzeyleri, *in vitro* sindirim modeli uygulanan örneklerde %51,71±1,10 ile %84,21±2,82 arasında bulunmuştur. En düşük AFB1 biyoerişilebilirlik düzeyi *L. leichmannii* + Beta glukan bulunan 5. test grubunda (%51,71±1,10) gözlenmiş ve kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Ayrıca 3., 4. ve 6. test gruplarında da AFB1 biyoerişilebilirlik düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Bunların yanında *L. leichmannii* bulunan 1. test grubu, *S. boulardii* bulunan 2. test grubu ve *L. leichmannii* + *S. boulardii* + Beta glukan bulunan 7. test grubundaki AFB1 biyoerişilebilirlik düzeyleri (sırasıyla %77,62±4,74, %77,38±3,80 ve %84,21±32,82) ile kontrol grubundaki AFB1 biyoerişilebilirlik düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0,05$).

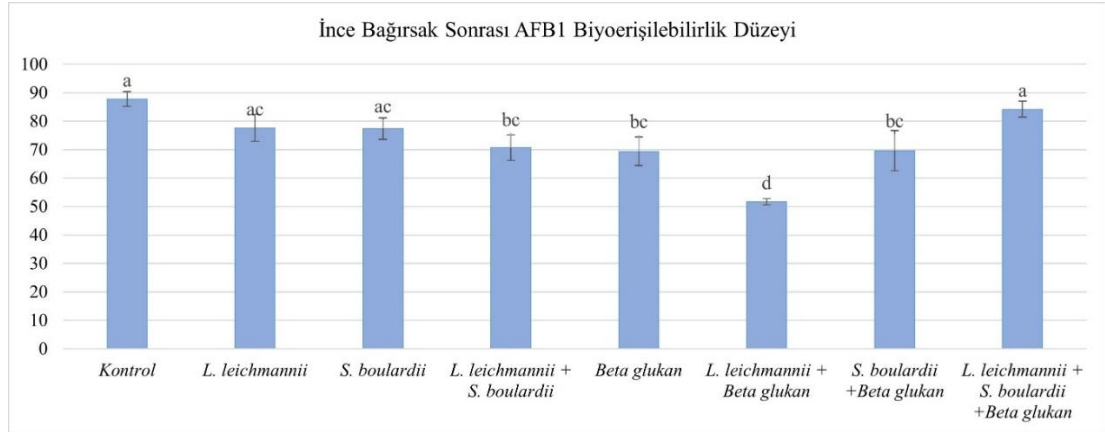
Bozada *in vitro* sindirim modeli kullanılarak ince bağırsak sonrası belirlenen AFB1 biyoerişilebilirlik düzeyleri Tablo 4.3.'te sunulmuş ve Şekil 4.7.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. *In vitro* sindirim modeli kullanılarak bozada ince bağırsak sonrası ölçülen AFB1 biyoerişilebilirlik seviyeleri

Test grupları	İnce Bağırsak Sonrası Biyoerişilebilirlik (%)	
Pozitif kontrol	Kontrol	87,80±2,60 ^a
1. grup	<i>L. leichmannii</i>	77,62±4,74 ^{ac}
2. grup	<i>S. boulardii</i>	77,38±3,80 ^{ac}
3. grup	<i>L. leichmannii</i> + <i>S. boulardii</i>	70,72±4,45 ^{bc}
4. grup	Beta glukan	69,40±5,04 ^{bc}
5. grup	<i>L. leichmannii</i> + Beta glukan	51,71±1,10 ^d
6. grup	<i>S. boulardii</i> +Beta glukan	69,63±7,01 ^{bc}
7. grup	<i>L. leichmannii</i> + <i>S. boulardii</i> +Beta glukan	84,21±2,82 ^a
p		<0,001

Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde sunulmuştur.

p değeri ANOVA yöntemi ile hesaplanmıştır. Aynı sütunda farklı harflerle belirtilen değerler, Post-Hoc Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir ($p < 0,05$).



Şekil 4.7. Çalışma gruplarında *in vitro* sindirim modeli kullanılarak ince bağırsak sonrası bozada ölçülen AFB1 biyoerişilebilirlik seviyeleri

Post-Hoc Tukey testine göre, farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları ($p < 0,05$), aynı harfler ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığını göstermektedir.

4.2.3. Probiyotik Maya ve Bakteri ile Beta Glukanın Kolon Sonrası Bozada AFB1 Biyoerişilebilirliği Üzerine Etkisi

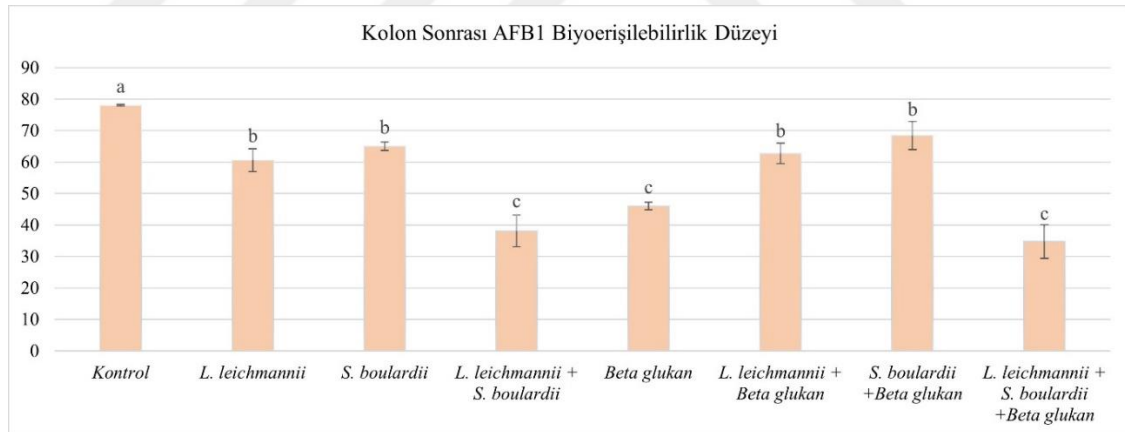
Kolon fazı eklenerek gerçekleştirilen *in vitro* sindirim modelinden sonra AFB1 biyoerişilebilirliğindeki en fazla azalmanın görüldüğü grup *L. leichmannii* + *S. boulardii* + Beta glukun eklenen 7. test grubu ($34,77 \pm 5,32$) olmuştur. İkinci en fazla düşüşün olduğu grup ise *L. leichmannii* + *S. boulardii* eklenen 3. test grubu ($38,12 \pm 5,02$) olarak tespit edilmiştir. Tüm test gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

Bozada *in vitro* sindirim modeli kullanılarak kolon sonrası belirlenen AFB1 biyoerişilebilirlik seviyeleri Tablo 4.4.'te sunulmuş ve Şekil 4.8.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.4. *In vitro* sindirim modeli kullanılarak bozada kolon sonrası ölçülen AFB1 biyoerişilebilirlik seviyeleri

Test grupları		Kolon Sonrası Biyoerişilebilirlik (%)
Pozitif kontrol	Kontrol	78,08±0,26 ^a
1. grup	<i>L. leichmannii</i>	60,62±3,65 ^b
2. grup	<i>S. boulardii</i>	65,05±1,33 ^b
3. grup	<i>L. leichmannii</i> + <i>S. boulardii</i>	38,12±5,02 ^c
4. grup	Beta glukan	46,05±1,25 ^c
5. grup	<i>L. leichmannii</i> + Beta glukan	62,79±3,26 ^b
6. grup	<i>S. boulardii</i> +Beta glukan	68,44±4,42 ^b
7. grup	<i>L. leichmannii</i> + <i>S. boulardii</i> +Beta glukan	34,77±5,32 ^c
p		<0,001

Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde sunulmuştur. p değeri ANOVA yöntemi ile hesaplanmıştır. Aynı sütunda farklı harflerle belirtilen değerler, Post-Hoc Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir (p<0,05).



Şekil 4.8. Çalışma gruplarında *in vitro* sindirim modeli kullanılarak kolon sonrası bozada ölçülen AFB1 biyoerişilebilirlik seviyeleri

Post-Hoc Tukey testine göre, farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları (p<0,05), aynı harfler ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığını göstermektedir.

4.3. Probiyotik Maya, Bakteri ve Beta Glukanın Bozada AFB1 Bağlanma Düzeylerine İnkübasyon ve *In Vitro* Sindirim Sonrası Etkisi

Çalışmada bulunan tüm örneklerin inkübasyon sonrası ile mide, ince bağırsak ve kolon *in vitro* sindirim modeli sonrasında belirlenen AFB1 bağlanma düzeyleri

Tablo 4.5.'te sunulmuş ve Şekil 4.9.'da gösterilmiştir. *In vitro* sindirim modeli uygulanan test gruplarında AFB1 bağlanma düzeyi mide sonrası ortalama $9,20 \pm 1,95$ ile $55,17 \pm 2,31$ arasında tespit edilmiştir. Mide sonrası en yüksek bağlanma *L. leichmannii* + *S. boulardii* bulunan 3. test grubunda, en düşük bağlanma ise *L. leichmannii* bulunan 1. test grubunda saptanmıştır. Buna göre 3., 4., 5., 6. ve 7. test gruplarında *in vitro* sindirim modelinde mide sonrası belirlenen AFB1 bağlanma düzeyi, inkübasyon sonrasında belirlenen AFB1 bağlanma düzeyine göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunurken ($p < 0,05$), 1. ve 2. test gruplarında anlamlı bir şekilde daha düşük bulunmuştur ($p < 0,05$).

In vitro sindirim modeli uygulanan test gruplarında AFB1 bağlanma düzeyi ince bağırsak sonrası ortalama $4,08 \pm 3,20$ ile $41,10 \pm 1,25$ arasında tespit edilmiştir. İnce bağırsak sonrası en yüksek bağlanma *L. leichmannii* + Beta glukan bulunan 5. test grubunda, en düşük bağlanma ise *L. leichmannii* + *S. boulardii* + Beta glukan bulunan 7. test grubunda tespit edilmiştir. *In vitro* sindirim modelinde ince bağırsak sonrasında 3., 4., 6. ve 7. test grubunda tespit edilen AFB1 bağlanma düzeyi mide sonrasına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0,05$). Diğer test gruplarında ise farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p > 0,05$).

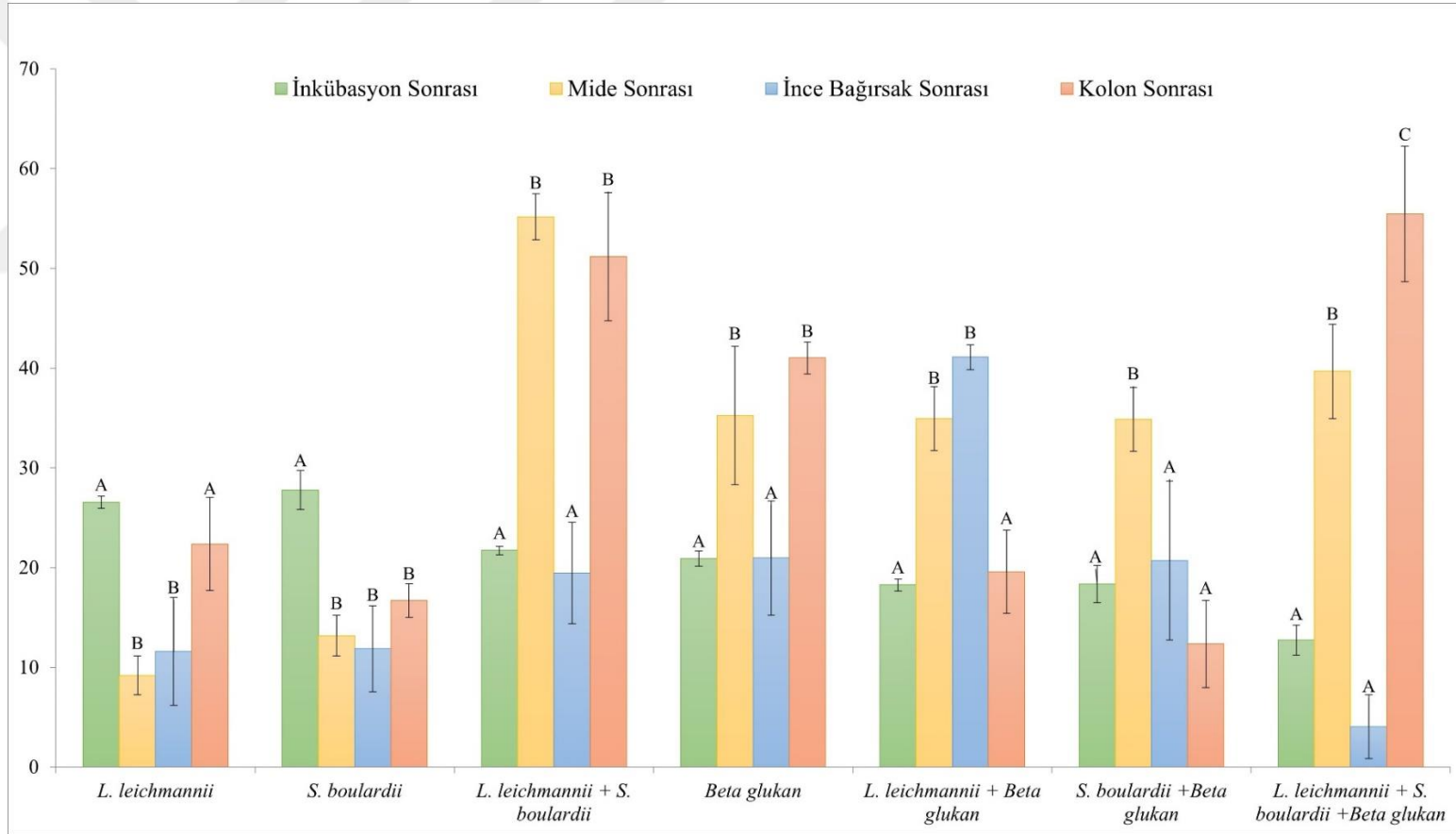
In vitro sindirim modeli uygulanan test gruplarında AFB1 bağlanma düzeyi kolon sonrası ise $12,34 \pm 4,37$ ile $55,46 \pm 6,81$ arasında tespit edilmiştir. Kolon sonrası en yüksek bağlanma *L. leichmannii* + *S. boulardii* + Beta glukan bulunan 7. test grubunda, en düşük bağlanma ise *S. boulardii* + Beta glukan bulunan 6. test grubunda tespit edilmiştir. *In vitro* sindirim modelinde kolon sonrasında 1., 3., 4. ve 7. test grubunda tespit edilen AFB1 bağlanma düzeyinde ince bağırsak sonrasına göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenirken ($p < 0,05$), 5. test grubunda kolon sonrası bağlanmada azalış tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Test grupları içinde, 2. ve 6. gruplarda AFB1 bağlanma düzeylerinin ince bağırsak sonrasına göre daha düşük olduğu bulunmuş, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Tablo 4.5. Çalışma gruplarında, bozada inkübasyon ve *in vitro* sindirim modeli sonrasında ölçülen AFB1 bağlanma oranları

Test grupları	Bağlanma Yüzdesi (%)			
	İnkübasyon Sonrası	Mide Sonrası	İnce Bağırsak Sonrası	Kolon Sonrası
1. grup <i>L. leichmannii</i>	26,54±0,59 ^a	9,20±1,95 ^a	11,59±5,40 ^{ad}	22,36±4,68 ^a
2. grup <i>S. boulardii</i>	27,79±1,95 ^a	13,17±2,04 ^a	11,86±4,32 ^{ad}	16,69±1,70 ^a
3. grup <i>L. leichmannii</i> + <i>S. boulardii</i>	21,72±0,41 ^b	55,17±2,31 ^b	19,46±5,07 ^a	51,17±6,42 ^{bc}
4. grup Beta glukan	20,89±0,78 ^b	35,25±6,94 ^c	20,95±5,73 ^a	41,02±1,60 ^b
5. grup <i>L. leichmannii</i> + Beta glukan	18,27±0,61 ^b	34,96±3,21 ^c	41,10±1,25 ^b	19,58±4,18 ^a
6. grup <i>S. boulardii</i> +Beta glukan	18,35±1,89 ^b	34,86±3,21 ^c	20,69±7,98 ^a	12,34±4,37 ^a
7. grup <i>L. leichmannii</i> + <i>S. boulardii</i> +Beta glukan	12,73±1,51 ^c	39,69±4,73 ^c	4,08±3,20 ^{cd}	55,46±6,81 ^c
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde sunulmuştur.

AFB1 bağlanma yüzdeleri tek yönlü ANOVA ile analiz edilmiştir. Aynı sütunda farklı harflerle belirtilen değerler, Post-Hoc Tukey testine göre istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir (p<0,05).



Şekil 4.9. Çalışma gruplarında, bozada inkübasyon ile mide, ince bağırsak ve kolon in vitro sindirimi sonrasında ölçülen AFB1 bağlanma oranları

Veriler ortalama \pm standart sapma şeklinde sunulmuştur.

AFB1 bağlanma düzeyleri tek yönlü ANOVA ile analiz edilmiş, gruplar arasındaki farkın anlamlılığı ise Post-Hoc Tukey testi ile değerlendirilmiştir.

ABC, her test grubunda kullanılan farklı büyük harfler, grubun kendi içindeki inkübasyon, mide, ince bağırsak ve kolon sonrası değerler arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farkları göstermektedir ($p < 0,05$).

5. TARTIŞMA

Probiyotik bakteri ve mayalar, besin karsinojenlerine bağlanma yetenekleriyle ilgi çekmektedir. Mikotoksinler de dahil çeşitli karsinojenlerle probiyotiklerin etkileşimleri araştırılmıştır. Bu amaçla probiyotik bakterilerin ve mayaların AFB1'e bağlanma kapasiteleri üzerinde çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar, probiyotiklerin sıvı besiyeri, PBS çözeltisi ve farklı besin modellerinde AFB1 ile etkileşimlerini inceleyerek anlamlı bulgular ortaya koymuştur (11, 15-17, 109-111). Elde edilen sonuçlar, probiyotiklerin AFB1'i bağlayarak toksisitesini azaltma potansiyelini göstermektedir. Bu bulgular, probiyotiklerin besin güvenliği ve halk sağlığı açısından potansiyel faydalarını vurgulamakta ve bu mikroorganizmaların koruyucu bir strateji olarak kullanılabilmesine işaret etmektedir. Bu çalışmada, probiyotik maya ve bakteri ile prebiyotik olarak beta glukanın tahıl bazlı fermente bir içecek olan bozadaki AFB1'e bağlanma seviyeleri ve AFB1'in biyoerişilebilirliği üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmada *L. leichmannii* probiyotik bakteri olarak, *S. bolardii* probiyotik maya olarak ve beta-glukan prebiyotik olarak tercih edilmiştir.

Çalışmada deneysel koşullar kontrol altında tutulmuştur. AFB1 konsantrasyonu 100 ng/mL olarak belirlenmiş, çalışma grupları 24 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon sıcaklığı 30°C olarak ayarlanmıştır. Ayrıca, probiyotik mikroorganizmaların konsantrasyonları da sabit tutulmuştur, bakteriler için 2×10^8 kob/mL ve mayalar için 2×10^6 kob/mL olacak şekilde belirlenmiştir. Prebiyotik olarak kullanılan beta-glukanın konsantrasyonu ise %1,5 olarak sabitlenmiştir. Beta glukun miktarı, önceki araştırmalarda beta glukunın prebiyotik etkilerini göstermek amacıyla günlük olarak önerilen miktar göz önünde bulundurularak ve bu miktarın bir porsiyon besinle karşılanabilmesi için eklenen miktar belirlenmiştir (75, 112, 113).

İnkübasyon süresinin probiyotiklerin mikotoksinlere bağlanma yeteneği üzerindeki net etkisi henüz belirlenmemiştir. Farklı inkübasyon süreleri (6, 12, 24, 46 ve 72 saat) kullanılarak probiyotik maya ve bakteri suşlarının bir kombinasyonu ile bebek mamasında AFB1'in bağlanmasının araştırıldığı bir çalışmada, daha uzun inkübasyon süresinin daha fazla aflatoksin bağlanmasına neden olduğu bulunmuştur (59). Benzer şekilde, Nyamete ve ark. (12) ile El Khoury ve ark. (114) inkübasyon süresinin uzamasıyla birlikte laktik asit bakterilerinin tüm suşlarında AFB1 ve AFM1'in azalmasının arttığını tespit etmiştir. Öte yandan, Serrano-Nino ve ark. (100)

ile Fakhrabadipour ve ark. (101) da inkübasyon süresinin uzatılmasının probiyotik bakterilerin mikotoksinlere daha fazla bağlanmadığı sonucuna varmıştır. Ayrıca, tahıl bazlı içecek olan bozanın fermentasyonu için gerekli sürenin 24 saat olduğu belirlenmiştir (115). Bu veriler doğrultusunda, 24 saatlik inkübasyon süresinin, test parametrelerinin bağlanma aktivitelerini değerlendirmek için yeterli olduğu sonucuna varılmıştır.

Aflatoksin bağlanması mikroorganizmanın başlangıç konsantrasyonundan etkilenmektedir. Sarlak ve ark. (102) yaptığı çalışmada, geleneksel İran fermente süt içeceğine 10^9 kob/mL *L. acidophilus* eklenmesinin, 10^7 kob/mL'den belirgin şekilde daha yüksek bir serbest AFM1 bağlama kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde, Rezasoltani ve ark. (116) *L. casei* ve *L. acidophilus* için AFM1 bağlanmasının 10^9 kob/mL bakteri konsantrasyonunda 10^7 kob/mL'ye kıyasla daha yüksek olduğunu göstermiştir. Kabak ve Var (117) da bazı probiyotik Lactobacillus suşlarının, bakteri konsantrasyonu 10^8 kob/mL ve daha yüksek olduğunda aflatoksin daha iyi bağlandığını bildirmiştir. Öte yandan, gıda endüstrisi, probiyotik mikroorganizmaların terapötik etki sağlayabilmesi için genellikle tüketim anında 10^6 kob/mL probiyotik bakteri seviyesini tavsiye etmektedir. Ancak, bu seviyeye ulaşmak için gıda ürünlerinin en az 10^8 - 10^9 kob/mL canlı hücre içermesi gerektiği belirtilmiştir (67). Bu çalışmanın sonuçları göz önünde bulundurulduğunda, en az 10^8 kob/mL canlı probiyotik mikroorganizma kullanımı, hem aflatoksin azatımı hem de fonksiyonel etkiler açısından iyi bir tercih olabilir (103).

5.1. Probiyotik Maya ve Bakteri ile Beta Glukanın Bozada Aflatoksin B1'e Bağlanma Düzeyleri

Başlangıçta 100 ng/ml AFB1 ile kontamine olan ve test parametreleri eklenen boza örneklerinde, inkübasyon sonrası AFB1 seviyelerinde %12,73 ile %27,79 arasında bir azalma belirlenmiştir (Tablo 4.1). Test parametrelerine bağlı olarak AFB1 bağlanma seviyeleri farklılık göstermiştir. En yüksek AFB1 bağlanma kapasitesi, %27,79 seviyesi ile *Saccharomyces boulardii* kullanıldığında elde edilmiştir. *Saccharomyces boulardii* suşunun besinlerde AFB1 bağlanması üzerine etkisini gösteren bir çalışma bulunmamakla birlikte, total aflatoksin ve AFM1 bağlanması üzerine etkisini gösteren çalışmalar mevcuttur (118, 119). Yer fıstığındaki aflatoksin

üretimini azaltmak amacıyla kullanılan *S. boulardii* 17 suşunun, aflatoksin seviyelerinde %65,8 oranında bir azalma sağladığı bildirilmiştir (118). Ayrıca, Martinez ve ark. (2019) *S. boulardii* RC009 suşunun sütte %25 oranında AFM1 bağlanma kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir (119). Khadivi ve arkadaşlarının (2020) yürüttükleri başka bir araştırma ise, farklı bir *S. boulardii* suşunun sütte %61,46 ile %93,20 arasında değişen oranlarda AFM1 bağlanma kapasitesi olduğunu ortaya koymuştur (96). Bu bulgular, farklı *S. boulardii* suşlarının süt gibi besinlerde aflatoksin bağlama kapasitesinde belirgin farklılıklar gösterdiğini ve bazı suşların bu konuda oldukça yüksek bir etkinlik sergileyebileceğini göstermektedir. Mikroorganizmaların AFB1'e bağlanma yeteneğinin hücre duvarı bileşimleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (103). Maya hücre duvarı, başlıca polisakkaritler, proteinler ve lipitlerden oluşur ve toksin ile etkileşim için karboksil, hidroksil, fosfat ve amin grupları gibi farklı fonksiyonel grupların yanı sıra alifatik zincirler ve aromatik karbon halkaları gibi hidrofobik adsorpsiyon bölgeleri sunmaktadır (120). Aflatoksinlerin laktik asit bakterilerine bağlanmasından sorumlu olan bakteri hücre duvarı bileşenleri ise polisakkaritler, peptidoglikanlar, lipoteikoik asit ve teikoik asittir (21, 121). Bu nedenle, probiyotik suşların farklı hücre duvarı yapıları ve bağlanma kapasitesi, etkinliklerinde farklı sonuçlara yol açmaktadır. Dolayısıyla, probiyotiklerin toksin bağlanma etkinliklerinin optimize edilmesi için, hücre duvarı yapılarının ve bağlanma mekanizmalarının ayrıntılı bir şekilde incelenmesi gerekmektedir.

İkinci en yüksek AFB1 bağlanma kapasitesi (%26,54) *L. leichmannii* bulunan örneklerde gözlenmiştir. Bu önemli bulgunun yanı sıra, *L. lactis*'in *Aspergillus* türleri üzerinde antagonist etkiler gösterdiği ve laboratuvar solüsyonlarında AFG1'e bağlanma yeteneğine sahip olduğu kanıtlanmıştır (122, 123). Ayrıca, Zinedine ve ark. (124) *L. lactis* Lb5 ve Lb8 suşlarının AFB1'e bağlanma oranının sırasıyla %16,81 ile %20,26 olduğunu göstermiştir. Probiyotik maya ve bakterinin birlikte kullanılması ile gerçekleşen AFB1 bağlanma seviyesi (%21,72±0,41) tek başına maya veya bakterinin sağladığı bağlanmadan daha düşük olduğu gösterilmiştir. Buna göre, *S. boulardii* ve *L. leichmannii* birlikte kullanıldığında AFB1 bağlanma kapasitesinde sinerjik bir etki oluşturmadığını ve bu iki mikroorganizmanın kombinasyonunun, tek başına kullanıldıklarında sağladıkları bağlanma seviyelerinin üzerine çıkamadığını ortaya koymaktadır.

Benzer dizayna sahip bir çalışmada mısır bazlı fermente bir gıda olan kwete üzerinde yapılan araştırmada, *L. rhamnosus* yoba 2012 ve *S. thermophilus* C106 kombinasyonu kullanılmıştır. Bu çalışmada, AFB1'in başlangıç seviyesi 40 ng/mL olarak belirlenmiş ve 30°C'de 24 saat süren inkübasyon sonrası AFB1'in en yüksek azalması %100 olarak ölçülmüştür. Bu sonuç, kullanılan probiyotik kombinasyonunun AFB1'i tamamen etkisiz hale getirme kapasitesine sahip olduğunu ve bu probiyotiklerin mısır bazlı fermente gıdalarda aflatoksinlerin giderilmesinde son derece etkili olabileceğini göstermektedir (11). Başka bir çalışmada, sütte *L. rhamnosus*, *L. plantarum* ve *S. boulardii* suşlarının ayrı ayrı ve kombinasyon halinde etkinlikleri detaylı bir şekilde incelenmiştir. Araştırma sonucunda, her bir suşun bireysel olarak aflatoksin bağlanma kapasitesi değerlendirildiğinde, farklı oranlarda etkinlik gösterdiği görülmüştür. Ancak, bu mikroorganizmaların hepsinin birlikte bulunduğu örneklerde, AFB1 bağlanma oranının %100 seviyesine ulaştığı gözlemlenmiştir. Bu bulgu, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* ve *S. boulardii* suşlarının kombinasyon halinde kullanımının aflatoksin bağlanma kapasitesini önemli ölçüde artırdığını ve bu mikroorganizma kombinasyonunun aflatoksinlerin giderilmesinde oldukça etkili bir strateji olabileceğini ortaya koymaktadır (96). Benzer şekilde Fakhrabadipour ve ark. (101) *S. cerevisiae* ve *B. bifidum* türlerinin sütte birlikte kullanımlarının ayrı ayrı kullanımlarına göre AFM1 bağlanmasının daha fazla olduğunu bildirmiştir. Sevim ve ark. (89)'nın araştırmasında *L. plantarum* ve *B. animalis*'in AFM1 üzerinde sinerjik etki gösterdiği belirtilirken, *L. plantarum* ve *B. bifidum*'un da yoğurta antagonist etki yarattığı gösterilmiştir. Çeşitli araştırmalar, probiyotik bakterilerin farklı türlerinin AFB1 bağlama kapasitesinin farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur (15, 60, 104, 125, 126). Probiyotiklerle aflatoksin etkileşimi için önerilen birincil mekanizma, metabolik bozunmadan ziyade yaygın olarak bağlanma olarak bilinen fiziksel adsorpsiyonu içerir. Aflatoksin bağlama kapasitesindeki farklılıklar, probiyotik suşların hücre duvarı yapılarındaki değişikliklere bağlanmıştır. Aflatoksinlerin laktik asit bakterilerine bağlanmasından sorumlu olan bakteri hücre duvarı bileşenleri polisakkaritler, peptidoglikanlar, lipoteikoik asit ve teikoik asittir (21, 88, 102). Ayrıca, AFB1'in hidrojen bağları ve van der Waals etkileşimleri yoluyla bakteri duvarlarında bulunan hücre β -d-glukanlarına bağlanma kabiliyetine sahip olduğu belirtilmiştir (93). Bir araştırmada, hücre

duvarının tamamen veya kısmen bozulmasının, aflatoksin bağlama kapasitesinde belirgin bir şekilde azalmaya yol açtığı belirtilmiştir (127). Bu çalışmada, probiyotik bakteri ve mayanın AFB1 bağlama kapasitelerinin farklılık gösterdiği saptanmıştır. Bu durum, bakteriler ve mayaların morfolojik yapıları, hücre duvarı bileşenleri ve miktarlarının farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, bu farklılıkların buldukları ortamdaki etkileşimlerini ve toksin bağlama kapasitelerini etkileyebileceği düşünülmektedir.

Prebiyotikler, sindirim sisteminin üst kısmında parçalanmadan ve emilmeden kalın bağırsağa ulaşabilen ve bağırsak mikrobiyotasının bileşimini veya aktivitesini etkileyerek avantaj sağlayan bileşenlerdir (79). Prebiyotikler içerisinde beta-glukan *in vitro* yapılan çalışmalarda *L. acidophilus*, *L. plantarum* ve *B. animalis subsp. lactis* suşları tarafından kullanılarak bu mikroorganizmaların canlılığını ve aktivitelerini arttırdığı gösterilmiştir (75-78). Bu çalışmada, beta-glukanın prebiyotik olarak AFB1 üzerindeki etkisi incelenmiş ve beta glukanın AFB1'i %20,8±1,09 oranında bağlama sağladığı görülmüştür. Bakteri ve mayanın birlikte kullanıldığı örneklerde AFB1'in bağlanma seviyesi %21,72±0,41 olarak belirlenirken, beta glukan eklendiğinde bu oranın %12,73±1,51'e düştüğü gözlemlenmiştir. Vasconcelos ve ark. (88), *L. plantarum* ve inülin, oligofruktoz, beta glukan ve polidekstroz gibi çeşitli prebiyotikler kullanarak sütte AFB1 seviyelerinin azaltılmasını araştırmıştır. Bu çalışmada, AFB1'de en yüksek azalma (%55,85) *L. plantarum* ile birlikte inülin, oligofruktoz ve beta glukan içeren sütte gözlenmiştir. Benzer şekilde, Wochner ve ark. (21) beta glukan ve polidekstroz ile birlikte sütteki AFB1 seviyesinde en yüksek düşüşün (%35,53) olduğunu göstermiştir. Yulaf bazlı beta-glukanın probiyotiklerin canlılığını korumasına ve aktivitesini arttırmasına yardımcı olduğunu gösteren araştırmalar mevcuttur (75-77). Ancak bu bulgulara karşılık, Vasilyeviç ve ark. (112) *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* probiyotik bakterilerinin canlılığı üzerinde beta-glukanın belirgin bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Bu çelişkili sonuçlar, prebiyotiklerin probiyotikler üzerindeki etkilerinin her bir probiyotik bakteriye özgü olabileceğini ve belirli probiyotiklerin beta glukan gibi prebiyotiklere farklı tepkiler verebileceğini göstermektedir. Ayrıca, kullanılan mikroorganizmaların türü, bu mikroorganizmalar arasındaki etkileşimler, beta-glukanın türü ve konsantrasyonu gibi faktörlerin de çalışmanın sonuçlarını etkileyebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

5.2. Probiyotik Maya ve Bakteri ile Beta Glukanın Bozada Biyoerişilebilirliği Üzerine Etkisi

Besinler yoluyla alınan bir toksin veya kirleticinin toplam miktarı, her zaman vücudun kullanabileceği miktarı göstermeyebilir. Toksin veya kirleticinin vücutta nasıl metabolize edildiği, emilim oranı, dağılımı ve atılım süreçleri gibi çeşitli faktörler bu durumu etkilemektedir. Bu nedenle, bir besinden alınan toksin miktarı yüksek olabilir, ancak bu miktarın vücutta ne kadar etkili bir şekilde kullanılacağı veya zararlı etkiler oluşturup oluşturmayacağı, vücudun biyolojik işleyişine bağlı olarak değişir. Dolayısıyla, besin yoluyla alınan toksinlerin sağlık üzerindeki potansiyel etkilerini doğru bir şekilde değerlendirebilmek için, bu toksinlerin biyoerişilebilirliği ve metabolizma süreçlerini de göz önünde bulundurmak gerekmektedir. Biyoerişilebilirlik, besinlerdeki toksin veya kirleticilerin sistemik dolaşıma geçen oranını ifade eden bir terimdir. Hayvanlar ve insanlar üzerinde yapılan deneyler, gıdalardaki bileşiklerin oral biyoyararlanımının, besin kaynağına, işlenmesine, veya gıda hazırlanmasına bağlı olarak önemli ölçüde değişebileceğini göstermektedir (22).

Sindirim süreçlerini simüle eden *in vitro* yöntemler, besin veya farmasötiklerin gastro-intestinal davranışlarını incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. İnsan beslenmesine ilişkin çalışmalar diyetle ilgili soruların ele alınmasında hala "altın standart" olarak kabul edilse de *in vitro* yöntemler, hızlı, ekonomik ve etik kısıtlamalardan bağımsız çalışmalar olmalarının yanı sıra, tekrarlanabilirlik ve kolay örnekleme açısından avantajlıdır. Bu özellikler, *in vitro* sindirim modellerini daha tercih edilebilir hala getirmektedir (105). Çeşitli besin modellerinde probiyotik bakterilerin AFB1'e bağlanarak AFB1 seviyesini azalttığını gösteren birçok kanıt bulunmaktadır (11, 15, 60, 99). Ancak, pratikte bu mikroorganizmalar ortamlardan uzaklaştırılmamış olup, üründe mikroorganizma-aflatoksin kompleksi olarak kalmaya devam etmektedir. Bu durum, ürünlerde serbest veya mikroorganizmaya bağlı toksinlerin bulunmasına bakılmaksızın tüketilmesine neden olmaktadır. Araştırmacıların bazıları (16, 21, 23), aflatoksin ile bağlanma gösteren mikroorganizmaların karsinojenlerin bağırsak lümeninden emilimini ve biyoerişilebilirliğini azaltabileceğini ifade etmiş olsa da, üründe oluşan aflatoksin-mikroorganizma kompleksinin, serbest aflatoksinle karşılaştırıldığında,

gastrointestinal sistemdeki biyoerişilebilirlik seviyesinin kesin olarak bilinmediğini belirtmektedir.

Bu araştırmada, probiyotik mikroorganizmalar ve beta-glukanın bozada AFB1 bağlanma kapasitesi belirlenmiş, ayrıca *in vitro* sindirim modeli kullanılarak AFB1'in biyoerişilebilirliği üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. *In vitro* sindirim modeli kullanılarak elde edilen verilere göre, bozada AFB1'in mide ve ince bağırsak sonrası biyoerişilebilirliği sırasıyla $92,46 \pm 0,82$ ve $87,80 \pm 2,60$ olarak tespit edilmiştir. Aflatoksin B1'in biyoerişilebilirliği üzerine yapılan ilk çalışma, Kabak ve arkadaşları tarafından 2009 yılında çeşitli besinlerde gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmada, AFB1'in biyoerişilebilirliğinin %86 ile %94 arasında değiştiği rapor edilmiştir (106). Ayrıca, Kabak ve Özbey (23) AFB1 biyoerişilebilirliğinin, gıda kontaminasyon düzeyine ve gıda matrisinin özelliklerine bağlı olarak %85,1 ile %98,1 arasında değişebileceğini belirtmiştir. Bu bulgular, AFB1'in farklı gıda matrislerinde vücutta ne kadar etkili bir şekilde emilebildiğini ve biyolojik olarak kullanılabilir olduğunu ortaya koymaktadır.

Mide *in vitro* sindirimi sonrası bozada en yüksek AFB1 bağlanması *L. leichmannii* + *S. boulardii* içeren örnekte tespit edilmiş ve bu örnekte AFB1 biyoerişilebilirliğinin $55,17 \pm 2,31$ oranında azaldığı görülmüştür. En düşük AFB1 bağlanması da *L. leichmannii* bulunan örnekte bulunmuş ve bu örnekte AFB1 biyoerişilebilirliği $9,20 \pm 1,95$ oranında azalmıştır. Bugüne kadar yapılan *in vitro* sindirim çalışmalarında, AFB1'in mide sonrası biyoerişilebilirliğini değerlendiren yalnızca bir çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmada, on beş farklı probiyotik suşun kullanıldığı sonuçlara göre, AFB1'in mide sonrası biyoerişilebilirliğinin %15,41 ile %98,09 oranında azaldığı tespit edilmiştir (18).

İnce bağırsak *in vitro* sindirimi sonrası bozada en yüksek AFB1 bağlanması *L. leichmannii* + Beta glukan bulunan örnekte gerçekleşmiş ve AFB1 biyoerişilebilirliği $41,10 \pm 1,25$ oranında azalmıştır. En düşük bağlanma ise *L. leichmannii* + *S. boulardii* + Beta glukan bulunan örnekte bulunmuş ve biyoerişilebilirliğinin $4,08 \pm 3,20$ oranında azaldığı tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada *L. acidophilus* ATCC 4356 ve *L. casei* ATCC 39392 probiyotik bakterilerinin AFB1'in biyoerişilebilirliğini %24,3 ile %70,0 oranında azalttığı gösterilmiştir (16). Benzer şekilde, Saladino ve ark. (18) on beş farklı probiyotik bakterinin AFB1 biyoerişilebilirliğinde %30,39-%96,73 oranında bir azalma sağladığını tespit etmiştir.

L. leichmannii ve *S. boulardii*'nin AFB1 biyoerişilebilirliği üzerindeki etkisinin bağlanma kapasiteleriyle benzer olduğu bulunmuştur. Probiyotik mikroorganizmaların birlikte kullanıldığı örneklerde ince bağırsak sonrası AFB1 biyoerişilebilirliğindeki azalma $19,46 \pm 5,07$ ile *S. boulardii* ($11,86 \pm 4,32$) ve *L. leichmannii* ($11,59 \pm 5,40$)'n tek başına sağladığı azalmadan daha yüksek bulunmuştur. Beta glukan tek başına AFB1 biyoerişilebilirliğini ince bağırsak sonrası $20,95 \pm 5,73$ oranında düşürürken, *L. leichmannii* + Beta glukan $41,10 \pm 1,25$ oranında ve *S. boulardii* + Beta glukan ise $20,69 \pm 7,98$ oranında düşürmüştür.

Aflatoksin B1 biyoerişilebilirliği üzerine mikroorganizmaların etkisi ile ilgili mevcut literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (16, 18, 21, 23, 88). Bu çalışmalarda genellikle ince bağırsak ortamını taklit eden sindirim modelleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ancak bu araştırmalarda, aflatoksin-mikroorganizma kompleksinin kolonda nasıl etkilendiği henüz tam olarak bilinmemektedir. Kolon, gastrointestinal sistemin önemli bir parçası olup, burada gerçekleşen biyokimyasal ve mikrobiyal süreçler, aflatoksinlerin metabolizması ve biyoerişilebilirliği üzerinde kritik bir rol oynayabilir. Dolayısıyla, kolon dahil edilmiş *in vitro* sindirim modeli çalışmaları, aflatoksin ve mikroorganizmalar arasındaki etkileşimlerin tüm gastrointestinal sistemde nasıl sonuçlandığını daha kapsamlı bir şekilde değerlendirebilmek için gereklidir. Bu tür çalışmalar, aflatoksin-mikroorganizma kompleksinin kolon ve diğer gastrointestinal bölümlerdeki davranışlarını anlamamıza yardımcı olabilir ve aflatoksinlerle mücadelede daha etkili stratejilerin geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

Bu çalışmada, literatürdeki eksiklikten yola çıkarak, kolon taklidi gerçekleştirmek için bakteriyel enzimler (Protease ve Viscozyme L) kullanılmıştır. Proteaz, peptit bağlarının hidrolizi ile proteinlerin katabolize edilmesi amacıyla ve tam ayrışma sağlamak için kullanılmaktadır (128). Viscozyme L de *Aspergillus* türünden elde edilen çoklu enzimatik bir komplekstir. Bu enzimler, hücre duvarı bileşenlerini parçalayarak lif sindirilebilirliğini arttırmak ve laktik asit bakterileri için substrat olarak suda çözünür karbonhidrat miktarını artırmak amacıyla kullanılmaktadır (129).

Bu çalışma kolon *in vitro* sindirimi sonrasında bozada AFB1'in biyoerişilebilirliği üzerine etkilerini inceleyen ilk çalışmadır ve AFB1'in biyoerişilebilirliği $78,08 \pm 0,26$ olarak bulunmuştur. Kolon sonrası tüm örneklerde

AFB1 biyoerişilebilirliği azalmıştır. Test grupları içerisinde en yüksek AFB1 bağlanması *L. leichmannii* + *S. boulardii* + Beta glukun bulunan 7. test grubunda görülmüş ve biyoerişilebilirliği %55,46±6,81 oranında azalmıştır. En düşük bağlanma ise *S. boulardii* + Beta glukun bulunan 6. test grubunda gerçekleşmiş ve biyoerişilebilirlik %12,34±4,37 oranında azalmıştır. Sevim ve ark. (130) sütte AFM1'in kolon sonrası biyoerişilebilirliğini ilk kez incelemiş ve AFM1'in kolon sonrası biyoerişilebilirliğini %81,40 olarak belirlemiştir.

Beta glukun, gastrointestinal sistemin üst kısmında sindirilmez ve kolona geçerek buradaki mikroflora tarafından fermentasyona uğrar (20). Bundan dolayı, *in vitro* sindirim modelinin kolon fazına kadar etki etmemesi beklenmektedir. Beta glukun içeren 4. test grubunda inkübasyon sonrası tespit edilen bağlanma (%20,89±0,78) ile *in vitro* sindirim kolon sonrası bağlanma (41,02±1,60) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p < 0,05$). Ek olarak, beta glukun içeren 4. test grubunda inkübasyon sonrası bağlanma ile *in vitro* sindirim ince bağırsak sonrası arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0,05$) (Bkz. Şekil 4.9.).

Aflatoksinler gibi kirletici maddelerin sindirim sisteminin mikrobiyal florasına bağlanma yeteneği, kirletici maddenin kimyasal yapısı ve bileşimi, kullanılan mikroorganizmaların türü ve miktarı, mikroorganizmaların fiziksel durumları, çevre koşulları ve sindirim salgılarının hacmi gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (16). Aflatoksin moleküllerinin spesifik bakterilerin hücre duvarı bileşenlerine bağlanabildiği düşünülmektedir. Bu bağlanma farklılıklarının, bakterilerin aflatoksinlere karşı etkinliğinin, farklı suşlarda bulunan farklı bağlanma bölgelerindeki değişikliklerden ya da suşlara özgü benzer bağlanma bölgelerindeki küçük farklılıklardan kaynaklanabileceği öne sürülmektedir. Çeşitli çalışmalarda, probiyotik mikroorganizmaların aflatoksine fiziksel bağlanması nedeniyle bu bağların geri dönüşümlü olabileceği öne sürülmektedir (18, 23, 131, 132). Ayrıca, bu bağların geri dönüşümlü olması, aflatoksinlerin bağlandığı probiyotiklerin sindirim süreci boyunca etkili olup olmadığını ve bu etkileşimlerin aflatoksinlerin vücutta nasıl davranacağı üzerinde nasıl bir etkisi olduğunu anlamak açısından önemlidir. Bu çalışmanın bulguları, aflatoksinlerin probiyotik mikroorganizmalar tarafından bağlanmasının geri dönüşümlü olduğunu desteklemektedir. Özellikle, besinlerde ölçülen bağlama düzeylerinin sindirim süreci boyunca değişebileceği gözlemlenmiştir (Bkz. Şekil 4.9.).

Bu durum, sindirim sırasında aflatoksinlerin mikroorganizmalardan ayrılabilceğini veya bağlanma seviyelerinin farklılaşabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak, test edilen probiyotik bakteri, maya ve prebiyotik olan beta glukon tahıl bazlı fermente içecek olan bozada, AFB1 bağlama kapasitesinde çeşitli seviyelerde etkiler göstermiştir. Bu çalışmada, *S. boulardii*'nin AFB1 bağlanmasında ilk kez kullanımı gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, probiyotik bakteriler, mayalar ve beta glukon kombinasyonlarının AFB1 bağlanma üzerindeki etkileri de ilk kez bu çalışmada değerlendirilmiştir. Literatürle karşılaştırma yaparken bazı sınırlamalar yaşanmış ve bu nedenle sonuçların geniş bir bağlamda yorumlanması zor olmuştur. İleri çalışmalarda dinamik bir *in vitro* sindirim modelinin kullanılması, kolon fazının mikrobiyal simülasyonu ve probiyotik mikroorganizmaların gastrointestinal sistem boyunca canlılığının değerlendirilmesi, probiyotik mikroorganizmalar ve mikotoksinlerin davranışlarının incelenmesinde önemli avantajlar sağlayacaktır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

Probiyotik bakteri (*Lactobacillus leichmannii*), probiyotik maya (*Saccharomyces boulardii*) ve prebiyotik (beta glukan) kullanımının bozada AFB1 biyoerişilebilirliği üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

1. Negatif kontrol örneklerinde inkübasyon sonrası AFB1 seviyeleri tespit limitinin altında kalırken, pozitif kontrol örneklerinde inkübasyon sonrası ortalama 99,519 ng/mL AFB1 tespit edilmiştir.
2. İnkübasyon sonrası *L. leichmannii*'nin AFB1 bağlanma seviyesi ortalama %26,54±0,59 oranında; *S. boulardii*'nin AFB1 bağlanma seviyesi %27,79±1,95 oranında; *L. leichmannii* + *S. boulardii*'nin birlikte bulunduğu örneklerde ise AFB1 bağlanma seviyesi %21,72±0,41 oranında belirlenmiştir.
3. İnkübasyon sonrası beta glukanın AFB1 bağlanma seviyesi ortalama %20,89±0,78 olarak tespit edilmiştir.
4. İnkübasyon sonrası *L. leichmannii* +Beta glukan, *S. boulardii* +Beta glukan ve *L. leichmannii* + *S. boulardii* +Beta glukan bulunan örneklerde AFB1 bağlanma seviyesi sırasıyla %18,27±0,61, %18,35±1,89 ve %12,73±1,51 oranlarında bulunmuştur.
5. İnkübasyon sonrası çalışma gruplarında tespit edilen AFB1 bağlanma kapasitesi ortalama %12,73±1,51 ile %27,79±1,95 arasında bulunmuştur. AFB1 bağlama kapasitesi *S. boulardii* bulunan örneklerde en yüksek olarak görülürken, en düşük AFB1 bağlama kapasitesi *L. leichmannii* + *S. boulardii* + Beta glukan bulunan örneklerde saptanmıştır. İki test grubu arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (p<0,001).
6. Bozada AFB1'in biyoerişilebilirliği, sırasıyla mide sonrasında %92,46±0,82, ince bağırsak sonrasında %87,80±2,60 ve kolon sonrasında %78,08±0,26 olarak tespit edilmiştir.
7. *In vitro* sindirim modeli uygulanan örneklerde, mide aşamasından sonra en düşük AFB1 biyoerişilebilirlik düzeyi %40,90±1,92 ile *L. leichmannii* + *S. boulardii* içeren örneklerde tespit edilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla AFB1

- biyoerişilebilirlik düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ($p < 0,001$).
8. *S. boulardii* bulunan örneklerde *in vitro* sindirim modeli mide aşamasından sonra AFB1 biyoerişilebilirlik düzeyi $80,28 \pm 1,88$ olarak belirlenmiş ve kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p < 0,001$).
 9. *L. leichmannii* bulunan örneklerde *in vitro* sindirim modeli mide aşamasından sonra AFB1 biyoerişilebilirlik düzeyi $83,95 \pm 1,80$ olarak belirlenmiş ve kontrol grubuna göre bir azalma tespit edilmiştir. Ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).
 10. *In vitro* sindirim modeli uygulanan örneklerde, mide aşamasından sonra beta glukanın ve beta glukana ile birlikte mikroorganizmalarında eklendiği örneklerde (*L. leichmannii* + Beta glukana; *S. boulardii* + Beta glukana; *L. leichmannii* + *S. boulardii* + Beta glukana) AFB1 biyoerişilebilirlik düzeyleri $55,77 \pm 4,38$ ile $60,23 \pm 2,97$ arasında tespit edilmiştir. Pozitif kontrol grubuna göre bir düşüş sağlandığı görülmekle birlikte bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p < 0,001$).
 11. *In vitro* sindirim modeli uygulanan örneklerde, ince bağırsak aşamasından sonra en düşük AFB1 biyoerişilebilirlik düzeyi *L. leichmannii* + Beta glukana bulunan örneklerde $51,71 \pm 1,10$ olarak gözlenmiş ve kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş tespit edilmiştir ($p < 0,001$).
 12. *L. leichmannii* ve *S. boulardii* içeren örneklerde *in vitro* sindirim modeli ince bağırsak aşamasından sonra AFB1 biyoerişilebilirlik düzeyleri sırasıyla $77,62 \pm 4,74$ ve $77,38 \pm 3,80$ olarak belirlenmiş ve kontrol grubundaki AFB1 biyoerişilebilirlik düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0,05$).
 13. *L. leichmannii* + *S. boulardii*, Beta glukana ve *S. boulardii* + Beta glukana içeren örneklerde *in vitro* sindirim modeli ince bağırsak aşamasından sonra AFB1 biyoerişilebilirlik düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p < 0,001$).
 14. Kolon fazı eklenerek gerçekleştirilen *in vitro* sindirim modelinden sonra *L. leichmannii* + *S. boulardii* + Beta glukana birlikte bulunduğu örneklerde AFB1 biyoerişilebilirliği $34,77 \pm 5,32$ olarak bulunmuş ve en fazla azalmanın bu grupta

olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş tespit edilmiştir ($p<0,001$).

15. Kolon fazı eklenerek gerçekleştirilen *in vitro* sindirim modelinden sonra *L. leichmannii* + *S. boulardii*'nin birlikte bulunduğu örneklerde AFB1 biyoerişilebilirlik düzeyi $38,12\pm 5,02$ olarak belirlenmiş ve kontrol grubuna göre anlamlı bir azalış tespit edilmiştir ($p<0,001$).
16. *In vitro* sindirim modeli uygulanan tüm örneklerde kolon aşamasından sonra AFB1 biyoerişilebilirlik düzeyleri kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur ($p<0,001$).
17. *L. leichmannii*'nin bağlanma kapasitesi inkübasyon sonrasına ($26,54\pm 0,59$) göre mide sonrası ($9,20\pm 1,95$) ve ince bağırsak sonrası ($11,59\pm 5,40$) istatistiksel olarak anlamlı bir azalış göstermiştir ($p<0,05$). Kolon sonrası ($22,36\pm 4,68$) da anlamlı olmayan bir azalma tespit edilmiştir ($p>0,05$).
18. *S. boulardii*'nin bağlanma kapasitesi inkübasyon sonrasına ($27,79\pm 1,95$) kıyasla mide sonrası ($13,17\pm 2,04$), ince bağırsak sonrası ($11,86\pm 4,32$) ve kolon sonrası ($16,69\pm 1,70$) istatistiksel olarak anlamlı bir azalış göstermiştir ($p<0,05$).
19. *L. leichmannii* ve *S. boulardii*'nin birlikte sağladıkları bağlanma düzeyi inkübasyon sonrasına kıyasla mide ve kolon sonrası istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,05$). İnce bağırsak sonrası da anlamlı olmayan bir azalma tespit edilmiştir ($p>0,05$).
20. *L. leichmannii* ve *S. boulardii* karışımına beta glukan eklendiğinde elde edilen bağlanma düzeyi inkübasyon sonrasına ($12,73\pm 1,51$) kıyasla mide sonrası ($39,69\pm 4,73$) ve kolon sonrası ($55,46\pm 6,81$) istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilirken ($p<0,05$), ince bağırsak sonrası ($4,08\pm 3,20$) anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p<0,05$).
21. Beta glukanın bağlanma kapasitesi inkübasyon sonrasına ($20,89\pm 0,78$) kıyasla mide ($35,25\pm 6,94$), ince bağırsak ($20,95\pm 5,73$) ve kolon sonrası ($41,02\pm 1,60$) artış göstermiştir. Mide ve kolon sonrası artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p<0,05$), ince bağırsak sonrasındaki artış anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

6.2. Öneriler

Mikotoksin kontaminasyonunu önlemek için iyi tarım uygulamaları ve doğru saklama koşulları en iyi stratejiler olarak kabul edilmektedir. İnsan ve hayvan sağlığını etkileyen başlıca mikotoksinler arasında gösterilen aflatoksin kontaminasyonunu ortadan kaldırmak veya biyoerişilebilirliğini azaltmak için çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler önerilmektedir. Bu yöntemler içerisinde aflatoksinlere bağlanabilen biyolojik ajanlar, toksinlerin biyoerişilebilirliğini azaltmak için etkili bir alternatiftir. Uygun suşların diyeteye eklenerek aflatoksinlerin gastrointestinal sistemdeki biyoerişilebilirliğinin ve zararlı etkilerinin azaltılması hedeflenmektedir.

AFB1 maruziyeti sağlık riskleri açısından önemlidir ve tüm aflatoksinler her zaman emilim için mevcut olmadığından, biyoerişilebilirlik değerlendirmeleri giderek daha kritik hale gelmektedir. Probiyotik mikroorganizma ve prebiyotiklerin AFB1 bağlanma düzeylerinin gastrointestinal sistem boyunca farklı sonuçlar ortaya koyduğu gösterilmiştir. Ayrıca, literatürde in vitro sindirim sürecinin mide, ince bağırsak ve kolon aşamalarını bir arada inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu kapsamlı değerlendirme, aflatoksinlerin sindirim sistemi içindeki davranışını ve mikroorganizmaların bu süreçteki rolünü daha iyi anlamamıza olanak sağlamıştır. Prebiyotik ve probiyotiklerin birlikte kullanımı, farklı sonuçlar doğurmuştur. Biyolojik ajanların yapısal çeşitliliği nedeniyle, ajan-toksin etkileşimleri değişkenlik gösterebilir ve bu da çeşitli AFB1 bağlanma seviyelerine yol açar. AFB1 bağlanma çalışmaları, biyoerişilebilirlik seviyelerinin doğru bir şekilde değerlendirilmesinin ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Bu değerlendirme, toksinlerin vücutta nasıl davrandığını ve mikroorganizmaların bu süreçteki etkilerini anlamak açısından kritik bir rol oynamaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Ismail A, Gonçalves BL, de Neeff DV, Ponzilacqua B, Coppa CF, Hintzsche H, et al. Aflatoxin in foodstuffs: Occurrence and recent advances in decontamination. *Food Research International*. 2018;113:74-85.
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. Ishikawa AT, Hirooka EY, Alvares e Silva PL, Bracarense APFRL, Flaiban KKMdC, Akagi CY, et al. Impact of a single oral acute dose of aflatoxin B1 on liver function/cytokines and the lymphoproliferative response in C57Bl/6 mice. *Toxins*. 2017;9(11):374.
4. Sun Y, Dong G, Guangxin E, Liao M, Tao L, Lv J. The effects of low levels of aflatoxin B1 on health, growth performance and reproductivity in male rabbits. *World Rabbit Science*. 2018;26(2):123-33.
5. Jiang M, Peng X, Fang J, Cui H, Yu Z, Chen Z. Effects of aflatoxin B1 on T-cell subsets and mRNA expression of cytokines in the intestine of broilers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(4):6945-59.
6. 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.
7. Kabak B. Aflatoxins in foodstuffs: Occurrence and risk assessment in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2021;96:103734.
8. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği [İnternet]. 2011 [Erişim Tarihi 20 Ekim 2023]. Erişim adresi: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-8.htm>
9. Marina CN A, Théodore N D, Marina K-C, Kouakou B. Effect of Fermentation Process on Nutritional Composition and Aflatoxins Concentration of Doklu, a Fermented Maize Based Food. *Food and Nutrition Sciences*. 2013;4(11):1120-1127.
10. Ahlberg SH, Joutsjoki V, Korhonen HJ. Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. *International Journal of Food Microbiology*. 2015;207:87-102.
11. Wacoo AP, Mukisa IM, Meeme R, Byakika S, Wendi D, Sybesma W, et al. Probiotic enrichment and reduction of aflatoxins in a traditional African maize-based fermented food. *Nutrients*. 2019;11(2):265.
12. Nyamete F, Bennink M, Mugula J. Potential of lactic acid fermentation in reducing aflatoxin B1 in Tanzania maize-based gruel. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*. 2016;16(3):11139-51.
13. Zendeboodi F, Khorshidian N, Mortazavian AM, da Cruz AG. Probiotic: conceptualization from a new approach. *Current Opinion in Food Science*. 2020;32:103-23.

14. Wochner KF, Becker-Algeri TA, Colla E, Badiale-Furlong E, Drunkler DA. The action of probiotic microorganisms on chemical contaminants in milk. *Critical Reviews in Microbiology*. 2018;44(1):112-23.
15. Mosallaie F, Jooyandeh H, Hojjati M, Fazlara A. Biological reduction of aflatoxin B1 in yogurt by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus*. *Food Science and Biotechnology*. 2020;29(6):793-803.
16. Tajik H, Sayadi M. Effects of probiotic bacteria of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* on aflatoxin B1 detoxification within a simulated gastrointestinal tract model. *Toxin Reviews*. 2022;41(1):92-9.
17. Chlebicz A, Śliżewska K. In vitro detoxification of aflatoxin B 1, deoxynivalenol, fumonisins, T-2 toxin and zearalenone by probiotic bacteria from genus *Lactobacillus* and *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2020;12:289-301.
18. Saladino F, Posarelli E, Luz C, Luciano F, Rodriguez-Estrada M, Mañes J, et al. Influence of probiotic microorganisms on aflatoxins B1 and B2 bioaccessibility evaluated with a simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2018;68:128-32.
19. Ashaolu TJ, Ashaolu JO. Prebiotics in vitro digestion by gut microbes, products' chemistry, and clinical relevance. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2021;105:13-9.
20. Shoukat M, Sorrentino A. Cereal β -glucan: a promising prebiotic polysaccharide and its impact on the gut health. *International Journal of Food Science & Technology*. 2021;56(5):2088-97.
21. Wochner KF, Moreira MC, 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(5):e12670.
22. Versantvoort CH, Oomen AG, Van de Kamp E, Rompelberg CJ, Sips AJ. Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*. 2005;43(1):31-40.
23. Kabak B, Ozbey F. Assessment of the bioaccessibility of aflatoxins from various food matrices using an in vitro digestion model, and the efficacy of probiotic bacteria in reducing bioaccessibility. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2012;27(1):21-31.
24. Haque MA, Wang Y, Shen Z, Li X, Saleemi MK, He C. Mycotoxin contamination and control strategy in human, domestic animal and poultry: A review. *Microbial Pathogenesis*. 2020;142:104095.
25. Ndiaye S, Zhang M, Fall M, Ayessou NM, Zhang Q, Li P. Current review of mycotoxin biodegradation and bioadsorption: Microorganisms, mechanisms, and main important applications. *Toxins*. 2022;14(11):729.
26. Milićević DR, Škrinjar M, Baltić T. Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: challenges for food safety control. *Toxins*. 2010;2(4):572-92.

27. Ji C, Fan Y, Zhao L. Review on biological degradation of mycotoxins. *Animal Nutrition*. 2016;2(3):127-33.
28. Cao W, Yu P, Yang K, Cao D. Aflatoxin B1: Metabolism, toxicology, and its involvement in oxidative stress and cancer development. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2022;32(6):395-419.
29. Raysyan A, Eremin SA, Beloglazova NV, De Saeger S, Gravel IV. Immunochemical approaches for detection of aflatoxin B1 in herbal medicines. *Phytochemical Analysis*. 2020;31(5):662-9.
30. Blount W. Turkey" X" disease. *J Brit Turkey Fed*. 1961;9:52-4.
31. Udomkun P, Wiredu AN, Nagle M, Müller J, Vanlauwe B, Bandyopadhyay R. Innovative technologies to manage aflatoxins in foods and feeds and the profitability of application—A review. *Food Control*. 2017;76:127-38.
32. Quadri S, Ms N, Kc C, Shantaram U, Hs E. An overview on chemistry, toxicity, analysis and control of aflatoxins. *International Journal of Chemical and Life Sciences*. 2012;2:1071-8.
33. Lin X, Hu X, Li F. Development of an in vitro digestion model for assessing the bioaccessibility of aflatoxin B group in foods. *Zhonghua yu Fang yi xue za zhi [Chinese Journal of Preventive Medicine]*. 2012;46(10):937-41.
34. Breinholt V, Schimerlik M, Dashwood R, Bailey G. Mechanisms of chlorophyllin anticarcinogenesis against aflatoxin B1: complex formation with the carcinogen. *Chemical Research in Toxicology*. 1995;8(4):506-14.
35. Dohnal V, Wu Q, Kuča K. Metabolism of aflatoxins: key enzymes and interindividual as well as interspecies differences. *Archives of Toxicology*. 2014;88:1635-44.
36. 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.
37. Gallagher EP, Kunze KL, Stapleton PL, Eaton DL. The kinetics of aflatoxin B1 oxidation by human cDNA-Expressed and human liver microsomal cytochromes P450 1A2 and 3A4. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1996;141(2):595-606.
38. Engin AB, Engin A. DNA damage checkpoint response to aflatoxin B1. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2019;65:90-6.
39. Neal G, Eaton D, Judah D, Verma A. Metabolism and toxicity of aflatoxins M1 and B1 in human-derived in Vitro Systems. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1998;151(1):152-8.
40. Liu Y, Wang W. Aflatoxin B1 impairs mitochondrial functions, activates ROS generation, induces apoptosis and involves Nrf2 signal pathway in primary broiler hepatocytes. *Animal Science Journal*. 2016;87(12):1490-500.
41. Carter AC, King JB, Mattes AO, Cai S, Singh N, Cichewicz RH. Natural-product-inspired compounds as countermeasures against the liver carcinogen aflatoxin B1. *Journal of Natural Products*. 2019;82(6):1694-703.

42. Zhang W, He H, Zang M, Wu Q, Zhao H, Lu L-l, et al. Genetic features of aflatoxin-associated hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2017;153(1):249-62. e2.
43. Zhou X, Gan F, Hou L, Liu Z, Su J, Lin Z, et al. Aflatoxin B1 induces immunotoxicity through the DNA methyltransferase-mediated JAK2/STAT3 pathway in 3D4/21 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2019;67(13):3772-80.
44. Díaz de León-Martínez L, Díaz-Barriga F, Barbier O, Ortíz DLG, Ortega-Romero M, Pérez-Vázquez F, et al. Evaluation of emerging biomarkers of renal damage and exposure to aflatoxin-B 1 in Mexican indigenous women: a pilot study. *Environmental Science and Pollution Research*. 2019;26:12205-16.
45. Hamid AS, Tesfamariam IG, Zhang Y, Zhang ZG. Aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: Geographical distribution, mechanism of action and prevention. *Oncology Letters*. 2013;5(4):1087-92.
46. McLean M, Dutton MF. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. *Pharmacology & Therapeutics*. 1995;65(2):163-92.
47. Wang J-S, Huang T, Su J, Liang F, Wei Z, Liang Y, et al. Hepatocellular carcinoma and aflatoxin exposure in Zhuqing village, Fusui county, People's Republic of China. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2001;10(2):143-6.
48. Marchese S, Polo A, Ariano A, Velotto S, Costantini S, Severino L. Aflatoxin B1 and M1: Biological properties and their involvement in cancer development. *Toxins*. 2018;10(6):214.
49. Turner PC, Moore SE, Hall AJ, Prentice AM, Wild CP. Modification of immune function through exposure to dietary aflatoxin in Gambian children. *Environmental Health Perspectives*. 2003;111(2):217-20.
50. Wogan GN. Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. *Cancer Research*. 1992;52(7_Supplement):2114s-8s.
51. Regulation E. 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006.
52. Özturan K, Ünsal C, Karakaya Y, Atasever M, Ceylan ZG, Atasever MA, et al. Erzurum'da tüketime sunulan buğday unlarının toplam aflatoksin, aflatoksin B1 ve okratoksin A yönünden incelenmesi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*. 2007;2(4):172-6.
53. Hepsağ F, Hayoğlu İ. Çukurova ve Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Satışa Sunulan Kırmızı Pul Biber ve Kuru İncirler'de Aflatoksin B1 ve Toplam Aflatoksin (B1, B2, G1, G2) İçeriğinin Yüksek Performans Sıvı Kromatografi Yöntemi ile Belirlenmesi. *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 2022;5(3):1393-406.
54. Demircioğlu S, Filazi A. Türkiye'de Üretilen Kırmızı Biberlerde Aflatoksin Kalıntılarının Araştırılması. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*. 2010;81(2):63-6.

55. Sun G, Wang S, Hu X, Su J, Zhang Y, Xie Y, et al. Co-contamination of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in food and human dietary exposure in three areas of China. *Food Additives and Contaminants*. 2011;28(4):461-70.
56. Charoenpornsook K, Kavisarasai P. Determination of aflatoxin B1 in food products in Thailand. *African Journal of Biotechnology*. 2014;13(53).
57. Ndagijimana R, Shahbaz U, Sun X. Aflatoxin B1 in food and feed: an overview on prevalence, determination and control tactics. *JAIR*. 2020;8:144.
58. Stoev SD. Food safety and increasing hazard of mycotoxin occurrence in foods and feeds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2013;53(9):887-901.
59. Hamad GM, Zahran E, Hafez EE. The efficacy of bacterial and yeasts strains and their combination to bind aflatoxin B1 and B2 in artificially contaminated infants food. *Journal of Food Safety*. 2017;37(4):e12365.
60. Pourmohammadi K, Sohrabi M, Hashemi SMB, Amiri MJ. A kinetic analysis of the aflatoxin detoxification potential of lactic acid bacteria in Terxine (a cereal-based food). *FEMS Microbiology Letters*. 2021;368(16):fnab104.
61. Latif A, Shehzad A, Niazi S, Zahid A, Ashraf W, Iqbal MW, et al. Probiotics: Mechanism of action, health benefits and their application in food industries. *Frontiers in Microbiology*. 2023;14.
62. Fenster K, Freeburg B, Hollard C, Wong C, Rønhave Laursen R, Ouwehand AC. The production and delivery of probiotics: A review of a practical approach. *Microorganisms*. 2019;7(3):83.
63. Tripathi MK, Giri SK. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*. 2014;9:225-41.
64. Azad MAK, Sarker M, Li T, Yin J. Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview. *BioMed Research International*. 2018;2018.
65. Khalighi A, Behdani R, Kouhestani S. Probiotics: a comprehensive review of their classification, mode of action and role in human nutrition. *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*. 2016;10:63646.
66. Lee YK, Salminen S. *Handbook of probiotics and prebiotics*: John Wiley & Sons; 2009.
67. Boylston TD, Vinderola CG, Ghoddusi HB, Reinheimer JA. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *International Dairy Journal*. 2004;14(5):375-87.
68. Türk Gıda Kodeksi Etiketleme Yönetmeliği [İnternet]. [Erişim Tarihi 15 Kasım 2023]. Erişim adresi: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-7.htm>.
69. Chugh B, Kamal-Eldin A. Bioactive compounds produced by probiotics in food products. *Current Opinion in Food Science*. 2020;32:76-82.
70. Gürsoy O, Kınık Ö. Laktobasiller ve probiyotik peynir üretiminde kullanım potansiyeller. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*. 2011;11(3):361-71.

71. Zhu F, Du B, Xu B. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. *Food Hydrocolloids*. 2016;52:275-88.
72. Henrion M, Francey C, Lê K-A, Lamothe L. Cereal B-glucans: The impact of processing and how it affects physiological responses. *Nutrients*. 2019;11(8):1729.
73. Joyce SA, Kamil A, Fleige L, Gahan CG. The cholesterol-lowering effect of oats and oat beta glucan: modes of action and potential role of bile acids and the microbiome. *Frontiers in Nutrition*. 2019;6:171.
74. Du B, Bian Z, Xu B. Skin health promotion effects of natural beta-glucan derived from cereals and microorganisms: a review. *Phytotherapy Research*. 2014;28(2):159-66.
75. Basyigit Kilic G, Akpinar Kankaya D. Assessment of technological characteristics of non-fat yoghurt manufactured with prebiotics and probiotic strains. *Journal of Food Science and Technology*. 2016;53:864-71.
76. Kurtuldu O, Ozcan T. Effect of β -glucan on the properties of probiotic set yoghurt with *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain Bb-12. *International Journal of Dairy Technology*. 2018;71:157-66.
77. S. Heydari AMM, M.R. Ehsani, M.A. Mohammadifar and H. Ezzatpanah. Biochemical, microbiological and sensory characteristics of probiotic yogurt containing various prebiotic compounds. *Ital J Food Sci*, vol 23 - 2011. 2011.
78. Rosburg V, Boylston T, White P. Viability of *Bifidobacteria* strains in yogurt with added oat beta-glucan and corn starch during cold storage. *Journal of Food Science*. 2010;75(5):C439-C44.
79. Davani-Davari D, Negahdaripour M, Karimzadeh I, Seifan M, Mohkam M, Masoumi SJ, et al. Prebiotics: definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. *Foods*. 2019;8(3):92.
80. de Paulo Farias D, de Araújo FF, Neri-Numa IA, Pastore GM. Prebiotics: Trends in food, health and technological applications. *Trends in Food Science & Technology*. 2019;93:23-35.
81. Singla V, Chakkaravarthi S. Applications of prebiotics in food industry: A review. *Food Science and Technology International*. 2017;23(8):649-67.
82. 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.
83. Luo Y, Liu X, Yuan L, Li J. Complicated interactions between bio-adsorbents and mycotoxins during mycotoxin adsorption: Current research and future prospects. *Trends in Food Science & Technology*. 2020;96:127-34.
84. Luo Y, Wang J, Liu B, Wang Z, Yuan Y, Yue T. Effect of yeast cell morphology, cell wall physical structure and chemical composition on patulin adsorption. *PLoS one*. 2015;10(8):e0136045.
85. Chaharaein M, Sadeghi E, Mohammadi R, Rouhi M, Soltani M. The effect of β -glucan and inulin on the reduction of aflatoxin B1 level and assessment of

- textural and sensory properties in chicken sausages. *Current Research in Food Science*. 2021;4:765-72.
86. 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.
 87. Paseephol T, Sherkat F. Probiotic stability of yoghurts containing Jerusalem artichoke inulins during refrigerated storage. *Journal of Functional Foods*. 2009;1(3):311-8.
 88. Vasconcelos RAM, Kalschne DL, Wochner KF, Moreira MCC, Becker-Algeri TA, Centenaro AI, et al. Feasibility of *L. plantarum* and prebiotics on Aflatoxin B 1 detoxification in cow milk. *Food Science and Technology*. 2020;41:627-32.
 89. 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.
 90. Valcheva R, Dieleman LA. Prebiotics: Definition and protective mechanisms. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2016;30(1):27-37.
 91. Pimentel TC, de Assis BBT, dos Santos Rocha C, Marcolino VA, Rosset M, Magnani M. Prebiotics in non-dairy products: Technological and physiological functionality, challenges, and perspectives. *Food Bioscience*. 2022;46:101585.
 92. Minuye M. Aflatoxin reduction mechanism of probiotics. *J Prob Health*. 2021;9:235.
 93. Emadi A, Eslami M, Yousefi B, Abdolshahi A. In vitro strain specific reducing of aflatoxin B1 by probiotic bacteria: a systematic review and meta-analysis. *Toxin Reviews*. 2022;41(3):995-1006.
 94. Byakika S, Mukisa IM, Wacoo AP, Kort R, Byaruhanga YB, Muyanja C. Potential application of lactic acid starters in the reduction of aflatoxin contamination in fermented sorghum-millet beverages. *International Journal of Food Contamination*. 2019;6(1):1-8.
 95. El-kest MM, El-Hariri M, Khafaga N, Refai MK. Studies on contamination of dairy products by aflatoxin M1 and its control by probiotics. *J Glob Biosci*. 2015;4(1):1294-312.
 96. 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.
 97. 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.
 98. Panwar R, Kumar N, Kashyap V, Ram C, Kapila R. Aflatoxin M 1 detoxification ability of probiotic *Lactobacilli* of Indian origin in in vitro digestion model. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2019;11:460-9.

99. Zhang Y, Wang P, Kong Q, Cotty PJ. Biotransformation of aflatoxin B1 by *Lactobacillus helveticus* FAM22155 in wheat bran by solid-state fermentation. *Food Chemistry*. 2021;341:128180.
100. Serrano-Niño J, Cavazos-Garduño A, Hernandez-Mendoza A, Applegate B, Ferruzzi M, San Martin-González M, et al. 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.
101. Fakhrabadipour M, Khajehrahimi AE, Haghdoost NS, Anvar SA, Tala M. Efficiency of *Bifidobacterium bifidum* and *Saccharomyces cerevisiae* for detoxification of aflatoxin M1 in skim milk. *International Journal of Dairy Technology*. 2023.
102. Sarlak Z, Rouhi M, Mohammadi R, Khaksar R, Mortazavian AM, Sohrabvandi S, et al. Probiotic biological strategies to decontaminate aflatoxin M1 in a traditional Iranian fermented milk drink (Doogh). *Food Control*. 2017;71:152-9.
103. Macit A, Sevim S, Kizil M. Aflatoxin B1 and M1 detoxification in foodstuffs: Examining the efficacy of probiotics with and without prebiotics—A systematic review. *Food Bioscience*. 2024:103724.
104. Marrez D, Shahy E, El-Sayed H, Sultan Y. Detoxification of aflatoxin B1 in milk using lactic acid bacteria. *Journal of Biological Sciences*. 2018;18(3):144-51.
105. Minekus M, Alming M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C, et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & Function*. 2014;5(6):1113-24.
106. 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.
107. Türk Gıda Kodeksi Beslenme ve Sağlık Beyanları Yönetmeliği [İnternet]. 2017 [Erişim Tarihi: 5 Mayıs 2024] Erişim adresi: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2017/01/20170126M1-5.htm>.
108. Papillo VA, Vitaglione P, Graziani G, Gokmen V, Fogliano V. Release of antioxidant capacity from five plant foods during a multistep enzymatic digestion protocol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014;62(18):4119-26.
109. 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.
110. Taheur FB, Fedhila K, Chaieb K, Kouidhi B, Bakhrouf A, Abrunhosa L. Adsorption of aflatoxin B1, zearalenone and ochratoxin A by microorganisms isolated from Kefir grains. *International Journal of Food Microbiology*. 2017;251:1-7

111. Topcu A, Bulat T, Wishah R, Boyacı IH. Detoxification of aflatoxin B1 and patulin by *Enterococcus faecium* strains. *International Journal of Food Microbiology*. 2010;139(3):202-5.
112. Vasiljevic T, Kealy T, Mishra V. Effects of β -glucan addition to a probiotic containing yogurt. *Journal of Food Science*. 2007;72(7):C405-C11.
113. Mykhalevych A, Polishchuk G, Nassar K, Osmak T, Buniowska-Olejnik M. β -Glucan as a techno-functional ingredient in dairy and milk-based products—a review. *Molecules*. 2022;27(19):6313.
114. El Khoury A, 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(10):1695-9.
115. Arici M, Daglioglu O. Boza: a lactic acid fermented cereal beverage as a traditional Turkish food. *Food Reviews International*. 2002;18(1):39-48.
116. Rezasoltani S, Ebrahimi NA, Boroujeni RK, Aghdaei HA, Norouzinia M. Detoxification of aflatoxin M1 by probiotics *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus casei*, and *Lactobacillus acidophilus* in reconstituted milk. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*. 2022;15(3):263.
117. 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.
118. Silva JFMd, Peluzio JM, Prado G, Madeira JEGC, Silva MO, de Morais PB, et al. Use of probiotics to control aflatoxin production in peanut grains. *The Scientific World Journal*. 2015;2015.
119. 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.
120. Pereyra CM, Gil S, Cristofolini A, Bonci M, Makita M, Monge MdP, et al. The production of yeast cell wall using an agroindustrial waste influences the wall thickness and is implicated on the aflatoxin B1 adsorption process. *Food Research International*. 2018;111:306-13.
121. Vasconcelos RAM, Kalschne DL, Wochner KF, Moreira MCC, Becker-Algeri TA, Centenaro AI, et al. Feasibility of *L. plantarum* and prebiotics on Aflatoxin B1 detoxification in cow milk. *Food Science and Technology*. 2020;41(suppl 2):627-32.
122. Kabli SA. Effect of some bioagents on growth and toxin production of *Aspergillus flavus* Link. *Arts and Humanities*. 2009;7(1).
123. Danial EN, Lamfon MY, Alghamdi LA, Alamri AM, Alghamdi MS, Alghamdi SA. Removal of aflatoxin G1 using lactic acid bacteria. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2021;45(1):e15090.
124. Zinedine A, Faid 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.

125. Rahaie S, Emam-Djomeh Z, Razavi SH, Mazaheri M. Evaluation of aflatoxin decontaminating by two strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in pistachio nuts. *International Journal of Food Science & Technology*. 2012;47(8):1647-53.
126. Oluwafemi F, Kumar M, Bandyopadhyay R, Ogunbanwo T, Ayanwande KB. Bio-detoxification of aflatoxin B1 in artificially contaminated maize grains using lactic acid bacteria. *Toxin Reviews*. 2010;29(3-4):115-22.
127. 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.
128. SIGMA. Protease from *Streptomyces griseus*, Type XIV, ≥ 3.5 units/mg solid, powder. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sigma/p5147>.
129. 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.
130. Sevim S, Macit A, Sancak B, Kizil M. Aflatoxin M1 mitigation by novel biological agents and evaluation of bioaccessibility with enzymatic digestion in milk. *Food Bioscience*. 2024;59:103998.
131. Wu Q, Jezkova A, Yuan Z, Pavlikova L, Dohnal V, Kuca K. Biological degradation of aflatoxins. *Drug Metabolism Reviews*. 2009;41(1):1-7.
132. Peng Z, Chen L, Zhu Y, Huang Y, Hu X, Wu Q, et al. Current major degradation methods for aflatoxins: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2018;80:155-66.

8. EKLER

EK 1. Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Arife Macit
Ödev başlığı: BOZADA PREBİYOTİK VE PROBİYOTİKLERİN AFLATOKSİN B1 ...
Gönderi Başlığı: BOZADA PREBİYOTİK VE PROBİYOTİKLERİN AFLATOKSİN B1 ...
Dosya adı: Arife_MAC_T_Doktora_Tezi_son.docx
Dosya boyutu: 1.99M
Sayfa sayısı: 57
Kelime sayısı: 10,936
Karakter sayısı: 78,811
Gönderim Tarihi: 07-Ağu-2024 01:39ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2413969007

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BOZADA PREBİYOTİK VE PROBİYOTİKLERİN AFLATOKSİN
B1 DETOKSİFİKASYONU VE BİYODİŞİLEBİLİRLİĞİ
ÜZERİNE ETKİSİ

Uzm. Dyt. Arife MACİT

Bilimsel ve Etik Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2024

Copyright 2024 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

EK 2. Orijinallik Ekran Çıktısı

BOZADA PREBİYOTİK VE PROBİYOTİKLERİN AFLATOKSİN B1 DETOKSİFİKASYONU VE BİYOERİŞİLEBİLİRLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 7	% 7	% 3	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 3
2	openaccess.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	open.metu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	Kah Kheng Goh, Yen-Wenn Liu, Po-Hsiu Kuo, Yu-Chu Ella Chung, Mong-Liang Lu, Chun-Hsin Chen. "Effect of probiotics on depressive symptoms: A meta-analysis of human studies", Psychiatry Research, 2019 Yayın	% 1
5	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	<% 1
6	Arife Macit, Sumeyra Sevim, Mevlude Kizil. "Aflatoxin B1 and M1 detoxification in foodstuffs: Examining the efficacy of probiotics with and without prebiotics – A systematic review", Food Bioscience, 2024 Yayın	<% 1

9. ÖZGEÇMİŞ

