

T.C.

İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BESLENME VE DİYETETİK ANA BİLİM DALI

BESLENME VE DİYETETİK BİLİM DALI

**ÜLKEMİZDE BEBEK VE KÜÇÜK ÇOCUK GIDALARINA
TAKVİYE EDİLMİŞ FOLİK ASİTİN
BİYOERİŞİLEBİLİRLİĞİNİN
İN VİTRO GASTROİNTESTİNAL SİSTEM İLE
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖMER FARUK MIZRAK

İSTANBUL

Mayıs, 2019

T.C.

İSTANBUL SABAHATTİN ZAİM ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BESLENME VE DİYETETİK ANA BİLİM DALI

BESLENME VE DİYETETİK BİLİM DALI

**ÜLKEMİZDE BEBEK VE KÜÇÜK ÇOCUK GIDALARINA
TAKVİYE EDİLMİŞ FOLİK ASİTİN BİYOERİŞİLEBİLİRLİĞİNİN
İN VİTRO GASTROİNTESTİNAL SİSTEM İLE İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖMER FARUK MIZRAK

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Mustafa YAMAN

İstanbul

Mayıs, 2019

TEZ ONAY FORMU

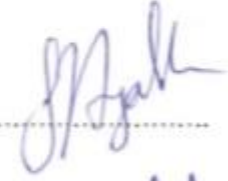
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma, jürimiz tarafından Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı, Beslenme ve Diyetetik Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman Dr. Öğr. Üyesi Mustafa YAMAN



Üye Dr. Öğr. Üyesi Sabiha Zeynep AYDENK KÖSEOĞLU



Üye Doç. Dr. Turgay ÇAKMAK



Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.



Prof. Dr. Ahmet Korhan BİNARK
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Yüksek lisans tezi olarak hazırladığım “Ülkemizde Bebek ve Küçük Çocuk Gıdalarına Takviye Edilmiş Folik Asitin Biyoerişilebilirliğinin İn Vitro Gastrointestinal Sistem ile İncelenmesi” adlı çalışmanın öneri aşamasından sonuçlandığı aşamaya kadar geçen süreçte bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle uyduğumu, tez içindeki tüm bilgileri bilimsel ahlak ve gelenek çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığımı, bu çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak yaptığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu beyan ederim.

 İmza
Ömer Fıruk MIZRAK

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Yaman'a, Sabiha Zeynep Aydenk Köseoğlu'na, eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Jale Çatak'a, bana her zaman yardımcı olan çok değerli çalışma arkadaşlarım H. Büşra Çalışkan, Sağrenur Akça, H. Feyza Bardakcı ve Hafsa Sena Sargın'a; hayatımın her anında destek olan aileme teşekkürlerimi sunarım.

Ömer Faruk MIZRAK

İstanbul – 2019

ÖZET

ÜLKEMİZDE BEBEK VE KÜÇÜK ÇOCUK GIDALARINA TAKVİYE EDİLMİŞ FOLİK ASİTİN BİYOERİŞİLEBİLİRLİĞİNİN İN VİTRO GASTROİNTESTİNAL SİSTEM İLE İNCELENMESİ

Ömer Faruk Mızrak

Yüksek Lisans, Beslenme ve Diyetetik

Mayıs- 2019, 60 sayfa

Bebeklerin ve çocukların büyüme ve gelişiminde yeterli ve dengeli beslenme önemlidir. Bebek maması temel olarak süt ve süt ürünleri ile formüle edilmektedir. Bebeklerin yeterli ve dengeli beslenmesi için bebek gıdalarına belirli miktarda vitamin ve mineral takviyesi yapılmaktadır. Süt ve süt ürünlerinde doğal folat miktarı çok düşük olduğundan bebek mamaları folik asit ile zenginleştirilmektedir. Ancak süt ve süt ürünlerinde belirli miktarda folat bağlayıcı protein bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı, in vitro bir gastrointestinal sindirim sistemi ile farklı mide pH değerleri altında süt ve süt ürünleri ile formüle edilmiş bebek ek gıdalarına, devam sütlerine ve mamalarına takviye edilen folik asidin biyoerişilebilirliğini tespit etmektir. Bebek maması örneklerinde folik asidin biyoerişilebilirliği mide pH 1.5'te % 56-71, mide pH 4'te % 35-49 arasında değişmektedir. Tahıl bazlı bebek ek gıdalarında (süt tozu dahil), mide pH 1.5'te % 59-78, mide pH 4'te % 31-67 arasında değişmektedir. Bebek devam sütlerinde, mide pH 1.5'te % 42-67 arasında değişmektedir ve mide pH 4'te % 38-57 arasında değişmektedir. Sonuç olarak, bebek mamasına eklenen folik asidin biyoerişilebilirliğinin hem folat bağlayıcı proteinlerden (FBP) hem de mide pH'ından etkilendiği düşünülmektedir. Bu nedenle folik asidin biyoerişilebilirliğinin yüksek mide pH'da düşük olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar folik asidin biyoerişilebilirliğinin in vivo olarak daha düşük olabileceğini gösterebilir.

Anahtar Kelimeler: Folik asit, Folat bağlayıcı protein, Biyoerişilebilirlik, Süt, Ek gıda.

ABSTRACT

DETERMINATION OF BIOACCESSIBILITY OF FORTIFIED FOLIC ACID IN INFANT FORMULA MILKS AND YOUNG CHILDREN FOLLOW-ON MILKS ANALYZED WITH IN VITRO GASTROINTESTINAL DIGESTIVE SYSTEM IN TURKEY

Ömer Faruk Mızrak

Master, Nutrition and Dietetics

May 2019, 60 pages

Adequate and balanced nutrition is important in the growth and development of infants and young children. Baby foods are mainly formulated with milk and milk products, although the amount of natural folate in the milk is very low.

The aim of this study was to determine the bioaccessibility of added folic acid in baby foods formulated with milk and milk products under conditions of different gastric pH values by an in vitro simulated gastrointestinal digestive system. In infant formula samples, the bioaccessibility of folic acid ranges between 56-71 % at gastric pH 1.5, while it ranges between 35-49 % at gastric pH 4. In cereal-based baby foods (including milk powder), it ranges between 59-78 % at gastric pH 1.5, and it ranges between 31-67% at gastric pH 4. In follow-on baby milk, it ranges between 42-67 % at gastric pH 1.5, and it ranges between 38-57 % at gastric pH 4.

Consequently, it is thought that the bioaccessibility of folic acid that is added to baby food is affected by both folate binding proteins (FBP) and gastric pH. Therefore, it was observed that the bioaccessibility of folic acid was lower in the higher gastric pH. These results may indicate that the bioaccessibility of folic acid may be lower in vivo.

Keywords: Folic acid, Folate binding protein, Bioavailability, Milk, Supplementary food.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	i
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ	ii
ÖNSÖZ.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
SEMBOLLER LİSTESİ.....	x
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
GİRİŞ	1

BİRİNCİ BÖLÜM

LİTERATÜR TARAMASI	3
1.1. Folik Asit.....	3
1.2. Folat.....	3
1.2.1. Folat Çeşitleri.....	5
1.2.2. Folat Bağlayıcı Protein (FBP)	5
1.3. Folatın Besinsel Kaynakları	7
1.3.1. Süt	7
1.3.2. Sütteki Folat ve Miktarı.....	8
1.3.3. Sütte Folat Bağlayıcı Protein ve Yapısı	8
1.4. Bebek Beslenmesinde Folik Asit Ve Folatın Önemi.....	9
1.5. Folik Asit Yetersizliği Sonuçları ve Takviyesi	10
1.6. Biyoyararlılık ve Biyoerişilebilirlik	11

1.6.1. Bebeklerin Mide pH'ları.....	12
1.6.2. FBP Mekanizması.....	12
1.6.3. Folat ve Folik Asit Biyoyararlılıkları.....	13
İKİNCİ BÖLÜM	
MATERYAL VE METOT	17
ÜÇÜNCÜ BÖLÜM	
BULGULAR.....	25
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM	
TARTIŞMA	34
BEŞİNCİ BÖLÜM	
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	38
KAYNAKLAR	40
ÖZGEÇMİŞ.....	48

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Etiket Değerleri	26
Tablo 2. pH 1.5 ve pH 4 Biyoerişilebilirlik Kıyaslamaları	27
Tablo 3. pH 1.5 ve pH 4 Biyoerişilebilirlik Yüzdeleri	29



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Folik asit kimyasal yapısı.	4
Şekil 2. Folat çeşitleri.	6
Şekil 3. Folik asit standardının HPLC kromatogramı.....	21
Şekil 4. Numunelerdeki folik asidin HPLC kromatogramı	21
Şekil 5. İn vitro gastrointestinal sindirim sistemi metodu	24
Şekil 6. Bebek mamalarındaki folik asidin biyoerişilebilirliği	30
Şekil 7. Tahıl bazlı bebek ek gıdalarındaki folik asidin biyoerişilebilirliği.....	31
Şekil 8. Devam sütlerindeki folik asidin biyoerişilebilirliği.....	32



SEMBOLLER LİSTESİ

%	:Yüzde
°C	:Santigrat derece
cm	:Santimetre
da	:Dekar
dk	:Dakika
g	:Gram
kcal	:Kalori
kg	:Kilogram
L	:Litre
M	:Molar
mg	:Miligram
ml	:Mililitre
Nm	:Nanometre
Rpm	: Revolutions Per Minute (Dakikadaki devir sayısı)
U	:Unite
µg	:Mikrogram
µl	:Mikrolitre
µm	:Mikrometre

KISALTMALAR LİSTESİ

ABD : Amerika Birleşik Devletleri

ACN : Asetonitril

DTU : Demark Gıda Veri Tabanı

FBP : Folat Bağlayıcı Protein

KVH : Kardiyovasküler Hastalıklar

MTHF : Metil Tetrahidrafolat

NTD : Nöral Tüp Defekti

PABA : Para-Aminobenzoik Asit

TCA : Trikloroasetik Asit

UHT : Ultra Yüksek Sıcaklık

USDA : ABD Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı

GİRİŞ

Yeterli ve dengeli beslenme, bebeklerin (0-6 ay) ve küçük çocukların (6-36 ay) büyüme ve gelişmesinde önemlidir. Anne sütü, bebeklerin büyümesi ve gelişmesi için gerekli besinleri içerir. Bu nedenle 6 aylık olana kadar bebeklerin anne sütü ile emzirilmesi önerilir. Bebekler 6. aydan sonra hızlı bir şekilde büyüdüğü için, anne sütü bebeğin tüm beslenme ihtiyaçlarını karşılamayabilir. Bu nedenle 6. aydan sonra tamamlayıcı bebek gıdaları verilir. Günümüzde, bebeklerin bu ihtiyacını karşılamak için, piyasada pek çok zenginleştirilmiş bebek ek gıdaları mevcuttur. Bu ek gıdalar süt, süt ürünleri, ekstrüde edilmiş tahıl ürünleri, vitamin ve mineraller ile formüle edilmiştir. Suda çözünen vitamin grubundan olan folat sütte düşük miktarda bulunduğundan sentetik formu olan folik asit ile zenginleştirilme yapılır (Hernell O., 2011; Lönnerdal B., 2013).

Suda çözünür bir vitamin olan folik asit sentetiktir ve gıdalarda doğal olarak bulunmaz. Folik asit yapı olarak doğal folata göre stabil ve biyoyararlılığı daha yüksek olan formudur. Folatlar genel olarak gıdalarda tetrahidrofolat (THF), 5-Metil THF ve 10-formil-THF poliglutamit formlarında bulunur. (Ball, G. F., 2013) Yeşil yapraklı sebzeler, karaciğer, böbrekler, tahıllar ve fındık folat için iyi bir kaynaktır (Arcot J. ve Shrestha A., 2005). Folatın poliglutamit formları, ince bağırsakta emilmeden önce monoglutamitlere hidrolize edilir. Plazmada 5- Metil THF şeklinde bulunur ve karaciğerde biyokimyasal olarak aktif olan THF'ye dönüştürülür. THF, hücre replikasyonu ve metilasyon reaksiyonlarında birçok rol oynar. Bir koenzim olarak THF, tek karbonlu birimler taşıyıcı ve deoksiribonükleik asit (DNA) sentezi için gerekli olan serin, glisin, histidin, kolin, metiyonin, pürin ve pirimidinlerin dönüşümlerinin metabolizmasına dahil olur. Homosistein, metiyoninin sisteine dönüşümünde oluşan bir ara üründür. THF, homosisteinin (Hcy) metionine remetilasyonu ile önemli bir rol oynar. Plazmadaki Hcy seviyesinin artması, kardiyovasküler hastalıklara (KVVH), alzheimer, farklı kanser türlerine, nörodegeneratif hastalıklara, hamilelik sırasındaki komplikasyonlara ve doğuştan gelen bozukluklara neden olabilir. Folat eksikliği nöral tüp defektlerine (NTD) neden olmaktadır. Bu nedenle günlük 400 µg folik asit takviyesinin gebelik öncesinde ve gebeliğin erken evrelerinde kullanılması önerilir (IOM, 1998).

İnek sütünde doğal folat seviyesi çok düşüktür ve süt % 90 oranında 5- Metil THF folat formu içerir. Folat yönünden zengin gıdalara kıyasla süt daha düşük miktarlarda folat içermektedir. Bebek mamaları çoğunlukla sütle formüle edilir ve süt içindeki doğal folat miktarı çok düşük olduğundan, yeterli beslenme için izin verilen sınırlarda folik asit takviye edilir.

İşlenmiş ve işlenmemiş süt belirli bir miktar çözünür folat bağlayıcı protein (FBP) içerir ve FBP miktarı folattan iki kat daha yüksektir. İnek sütünden izole edilen FBP'nin yapısında 222 amino asit bulunur (Birn, H., vd., 2005). FBP bağırsak bakterileri tarafından folat alımını önlemekte, bozulmalara karşı korumakta ve folatın bağırsak mukozasına taşınmasına yardımcı olmaktadır. Çiğ ve pastörize inek sütünde FBP miktarı 90-350 mg / kg, inek sütünde ise 310-2280 mg / kg'dır. Sentetik folik asit, 5-MTHF formuyla karşılaştırıldığında, FBP'ye bağlanmada yaklaşık 100 kat daha yüksek afiniteye sahiptir. Asitli mide koşulları altında (pH < 4.5), folik asit FBP'den ayrılır ve ince bağırsakta (pH-6-7) tekrar bağlanır (Verwei M., 2004).

In vivo çalışmalar zaman, maliyet ve etik problemler açısından zorluk taşıdığından, günümüzde gıdaların biyoerişilebilirliği daha çok in vitro sistemler ile çalışılmaktadır. Bu çalışmalar simüle edilmiş in vitro sindirim sistemi ile gerçekleştirilir (Sopade P.A. ve Gidley M.J. 2009). İn vivo ve in vitro çalışmalar arasında korelasyonların olduğu görülmüş ve bu metotlar çalışmamızda kullanılmıştır. Çalışmamızda simüle edilmiş in vitro gastrointestinal sindirim sistemi ile folik asit içeren devam sütleri, ek gıdalar ve mamalarının biyoerişilebilirliği incelenmiştir. Yapılan bu çalışmanın amacı, in vitro gastrointestinal sindirim sistemi ile simüle edilerek süt ve süt ürünleri ile formüle edilmiş bebek gıdalarında eklenen folik asidin farklı mide pH değerlerindeki biyoerişilebilirliğini incelemektir.

BİRİNCİ BÖLÜM

LİTERATÜR TARAMASI

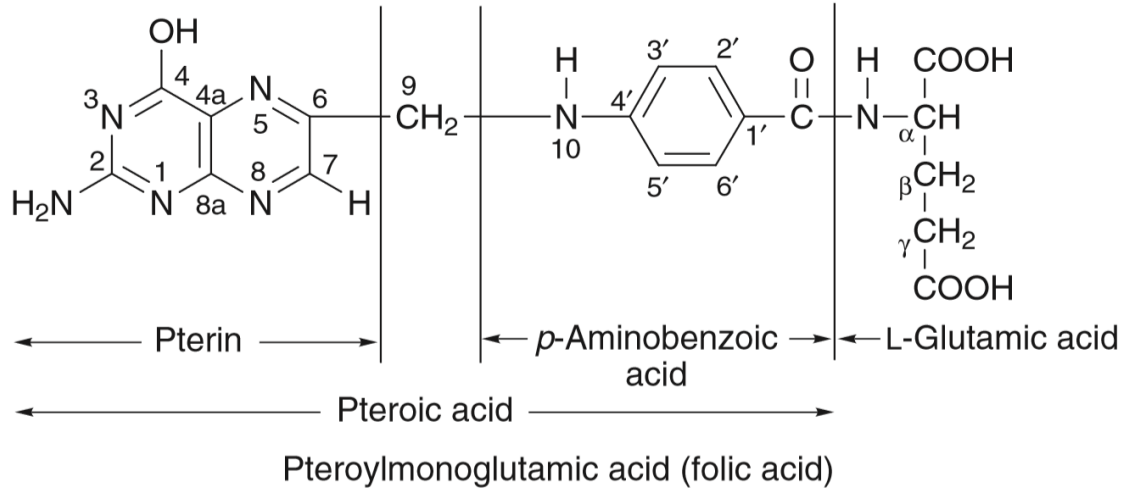
1.1. Folik Asit

Folik asit, suda çözünen bir vitamindir ve gıdalarda doğal olarak bulunmaz. Folik asit, bir hetero-bisiklik pteridin halkası, para-aminobenzoik asit (PABA) ve glutamik asit olmak üzere üç ana yapıdan oluşmaktadır (Ball, 2005). Ayrıca yapısında sadece bir glutamik asit içerdiğinden dolayı "pteroylglutamic acid, PteGlu" olarak da adlandırılmaktadır (Snow, C. F., 1999; Lucock M., 2000; Ball G.F.M., 2004). Folik asit gıdalardaki tüm folatların en stabil ve biyoyararlanımı yüksek olan formu olduğundan dolayı; genellikle gıda takviyesi ve farmasötiklerin formülasyonu için kullanılmaktadır (Cuskelly G.J. vd., 1996; Landen vd., 2016; Elliot, 2008; Zema, P, 2018).

Doğal gıdaların çoğunda folat, pteridin halkası, 7,8-dihidrofolat (DHF) veya 5,6,7,8-tetrahidrofolat (THF) formuna indirgenir (Şekil 17.1). Bu indirgenmiş formlar, 5 veya 10 nitrojen pozisyonlarına tutturulmuş veya her iki pozisyon arasında karbon atomu ile kovalent olarak bağlanmış halde bulunur. 10-formil-THF, 5-MTHF, 5-formimino-THF ve 5,10-metilen-THF formları folat metabolizmasının önemli ara maddeleridir.

1.2. Folat

Folat, insanlarda vitamin aktivitesini gösteren tüm pteroid asit türevleri için genel bir tanımlayıcı olarak kullanılır. Ana folat bileşiği, metilen bir köprü ile p-aminobenzoik aside bağlanan bisiklik bir pterin molekülü içerir ve bir α -peptid bağı ile tek bir L-glutamik asit molekülüne bağlanır.



Şekil 1. Folik asit kimyasal yapısı.

Folat, suda çözünen B₉ vitaminleri için toplu bir terimdir. Bir veya daha fazla L-glutamik asit kalıntısı ile konjuge edilmiş 4 - (pteridin-6-metilamino) benzoik asidin iskeletine dayalı bir grup heterosiklik bileşiktir (Zema P. ve Pilosof A.M., 2018). Folat, pürin ve pirimidin biyosentezinde karbon transfer reaksiyonuna ve amino asit interkonversiyonlarına katılan suda çözünen bir vitamindir (Krumdieck C.L., 1990).

Folat folik asit gibi biyolojik aktivite gösterir ve genellikle beş ile yedi glutamik asit molekülü içeren poliglutamat formunda bulunmaktadır (Ball G.F.M., 2004; Eitenmiller R.R., Landen Jr W.O. ve Ye L., 2016; Snow, C. F., 1999; Lucock M., 2000). Diyet folatı, poliglutamat konjugat bileşikleri, indirgenmiş folatlar ve tetrahidrofolatlar dahil olmak üzere folat bileşiklerinin kompleks ve değişken bir karışımıdır (Anonim, 2006).

Folatlar genel olarak gıdalarda proteinlere (Ball, G. F., 2013) ve depo polisakkaritlere (çeşitli nişasta ve glikojen tipleri) bağlı şekilde bulunur (Ball, 2005). İnsanlar ve hayvanlar folatları sentezleyemezler, bu nedenle de alımları tamamen besinsel kaynaklara bağlıdır (Rébeillé F., vd., 2006; Scott J., Rébeillé F. ve Fletcher J., 2000). Folatlar, nükleik asitlerin ve proteinlerin sentezi gibi temel biyolojik işlemlerde yer alır. Bu nedenle yetersizliği nöral tüp defektleri gibi konjenital hastalıklara neden olabilir (Refsum H., 2001).

1.2.1. Folat Çeşitleri

Folat olarak sınıflandırılabilen 100'den fazla türev vardır ve Folik asitin besin aktiviteleri ile benzerdir (Uysal U.D., Oncu-Kaya, E.M. ve Tunçel M., 2010)

Folatın poliglutamat formları, canlı hücrelerin temel bir biyokimyasal bileşenidir ve gama-glutamil hidrolaz ile ince bağırsakta absorbe edilmeden önce monoglutamatlara hidrolize edilir (Bender, D. A., 2003). Folat plazmada 5-MTHF formunda bulunur ve karaciğerde biyokimyasal olarak aktif olan THF'ye dönüştürülür.

Doğal formdaki folatların bazıları, 5- MTHF, 5-formiltetrahidrofolat (5-HCO-H4PteGlu) ve 10-formiltetrahidrofolat (10-HCO-H4Pte-Glu)'dir.

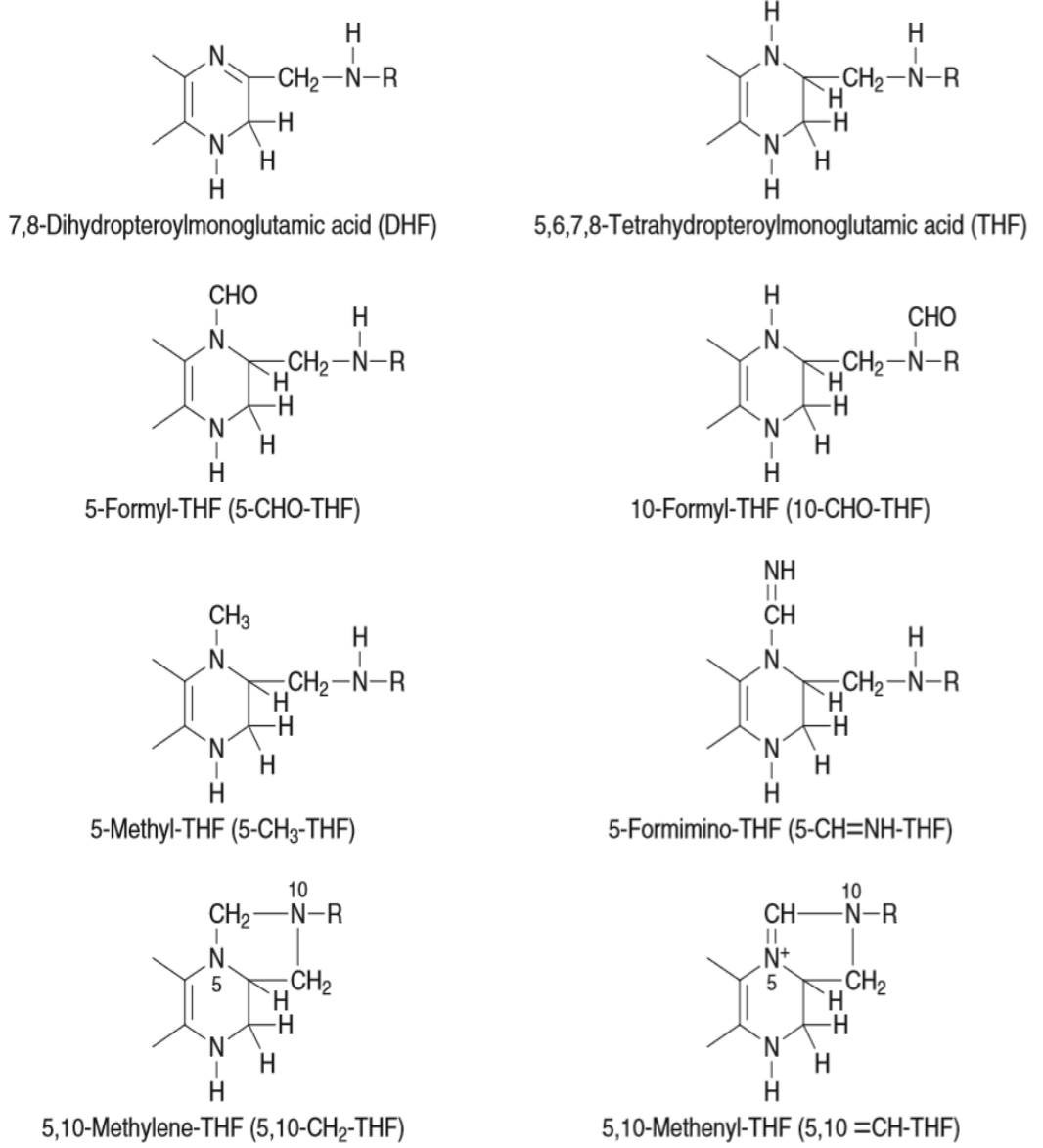
Hayvansal ürünlerdeki başlıca folat formları 5-metil tetrahidrofolat (5-CH3-H4 folat) ve tetrahidrofolat (H4 folat); meyve ve sebzelerde 5- MTHF folat (Indrawati, vd., 2004); tahıl ürünlerinde 5-formil tetrahidrofolat (5-HCO-H4 folat), 10-formil-folik asit, 5-CH3-H4 folattır (Ball G.F., 2005). 5-MTHF, biyolojik olarak en aktif folat formudur ve folik asitin kullanılması için vücutta dönüştürülmesi gereken moleküldür (Anonim, 2006; Lin, M. Y., ve Young, C. M., 2000).

Tüm folat bileşikleri ağırlıklı olarak γ -peptid bağları ile beş ve yedi glutamat kalıntısı içeren poliglutamatlar olarak bulunur. Folat konjugatları PteGlu'n türevlerine kısaltılır; örneğin, 5-MTHF; PteGlu3, triglutamil-5-MTHF asidi belirtir.

1.2.2. Folat Bağlayıcı Protein (FBP)

FBP folata bağlanarak folatın taşınmasında rol oynamakta ve folatı bozulmalara karşı korumaktadır (Nygren, L., Sternesjö, Å., ve Björck, L., 2003; Nygren-Babol, L., ve Jägerstad, M., 2012). FBP'nin folat biyoyararlanımındaki rolü ve emilimine etkisi, gastrointestinal sistem sonrası folatın bağlanmasıyla ilişkilidir. Asidik gastrik koşullar altında FBP'den ayrılan folik asit ince bağırsakta (pH 6-7) FBP'ye yeniden bağlanmaktadır. Gastrointestinal sistemin sonunda FBP kısmen denatüre olmakta ve folat biyoyararlılığını etkilemektedir. Folik asit ve 5-MTHF FBP'ye farklı miktarlarda bağlanmaktadır. FBP'nin bağlanma kapasitesi folik asit takviyeli süt ürünlerinde, 5-MTHF takviyeli süt ürünlerine göre daha yüksek bulunmuştur. Folik asit ve 5-

MTHF'in gastrointestinal sistem sonunda FBP'ye bağlanması biyoyararlılıklarını azaltmaktadır (Verwei M., vd., 2004).



Şekil 2. Folat çeşitleri.

1.3. Folatın Besinsel Kaynakları

İnsanlar ve hayvanlar folatları sentezleyemezler, bu nedenle (Rébeillé F., vd., 2006; Scott J., Rébeillé F. ve Fletcher J., 2000) bitkisel besinler diyetteki temel folat kaynağıdır.

Gıdalardaki folat seviyeleri değişmektedir. Doğal gıdalar arasında folatlar; tahıllar, baklagiller de dahil olmak üzere marul, kuşkonmaz, brokoli, portakal suyu, buğday tohumunda, ayçiçeği tohumu, karnabahar ve lahanada, (Chew S.C., Loh, S.P. ve Khor G.L., 2012) karaciğerde, böbreklerde ve yeşil yapraklı sebzelerde (fasulye, bezelye ve ıspanak gibi) yüksek miktarlarda bulunmaktadır (Arcot J. ve Shrestha A., 2005; United States Department of Agriculture (USDA), 2010; Office of Dietary Supplements (ODS), 2009; Anonim, 2006; Bassett M.N. ve Sammán N.C., 2010). Miktar ve biyoyararlanım açısından en iyi folat kaynakları karaciğer, zenginleştirilmiş kahvaltılık gevrekler, tahıl ürünleri, baklagiller ve yeşil yapraklı sebzelerdir (Arcot J. ve Shrestha A., 2005).

1.3.1. Süt

Folat alımını artırmak için folik asit takviyesi yapılan potansiyel bir gıda olarak süt ve süt ürünleri kullanılır. İşlenmemiş sütte doğal olarak bulunan 5-MTHF FBP'ye bağlanır (Birn, H., 2006; Kane, M. A., ve Waxman, S., 1990), mono ve poliglutamatların bir karışımı olarak bulunur (Konings E.J., vd., 2001; LeBlanc, J. G., vd., 2007. Sütün yapısında bulunan FBP özellikle folat biyoyararlanımında etkili olmaktadır (Verwei M., vd., 2003).

Yeterli ve dengeli beslenme, bebek (0-6 ay) ve küçük çocukların (6-36 ay) büyüme ve gelişmesinde önemlidir. Anne sütü, bebeklerin büyümesi ve gelişmesi için gerekli besinleri içermektedir. Bu nedenle, bebek beslenmesinde ilk 6 ay anne sütü önerilmektedir (Hernell O., 2011; Lönnerdal B., 2013).

Bebek mamaları genel olarak süt ve süt ürünleriyle formüle edilmekte ve sütte bulunan doğal folat miktarı çok düşük olduğundan, yeterli beslenmeye izin verilen miktarlarda folik asit takviyesi yapılmaktadır (Verwei M., 2004).

1.3.2. Sütteki Folat ve Miktarı

Sütte bulunan folat konsantrasyonu, folat bakımından zengin gıda ürünlerine kıyasla daha düşük olsa da, yüksek süt tüketimine sahip ülkelerde günlük folat alımının % 10-15'inden sorumludur (Konings, E.J., vd., 2001). Süt, folik asit veya 5-MTHF takviyesi için potansiyel bir matristir çünkü yaygın olarak tüketilmekte ve folat biyoyararlanımını artırmaktadır (Verwei M., vd., 2004).

ABD Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı (USDA) ve Demark Gıda Veri tabanına (DTU) göre, inek sütündeki toplam folat miktarı 5-10 µg / 100 g aralığında, süt tozu ve yağsız sütte ise 15-60 µg / 100 g aralığındadır. Bebek mamaları genel olarak süt ve süt ürünleri ile formüle edilmektedir (Verwei M., vd., 2004).

1.3.3. Sütte Folat Bağlayıcı Protein ve Yapısı

Süt çözünür FBP içermektedir (Nygren-Babol L. ve Karonen K.L., 2009). FBP, folik aside folatın 5-MTHF formundan yaklaşık 100 kat daha yüksek afiniteye sahiptir (Nygren-Babol L., vd., 2005).

İşlenmiş ve işlenmemiş süt belirli miktarlarda folat bağlayıcı protein (FBP) içerir ve FBP'nin folata molar oranı sütte 1:1'dir (Paulos, C. M., vd., 2004). İnek sütünden izole edilen FBP yapısı 222 amino aside sahiptir ve sekiz adet disülfür köprüsü içermektedir. Molekül ağırlığı yaklaşık 30.000-35.000 Da'dır (Birn, H., vd., 2005). FBP folatın bağırsak bakterileri tarafından alınmasını önlemede, vücut ısısında bozulmalara karşı (Nygren, L., Sternesjö, Å., ve Björck, L., 2003) korunmasında ve folatın bağırsak mukozasına taşınmasında etkili olmaktadır (Lönnerdal, B.; 2003; Jones, M. L., Treloar, T., ve Nixon, P. F., 2003). Bu etkilerinden dolayı FBP folatların biyoyararlanımında önemli bir rol oynamaktadır (Swiatlo N., vd., 1990). Çiğ, ısıtılmış işlem görmemiş inek sütünde FBP aralığı 90-350 mg/kg'dır (LNB, vd., 2004); pastörize inek sütünde 168 mg/kg'dır (Wigettr K., vd., 1996) ; toz haldeki inek sütünde ise 2280-4450 mg / kg'dır (Swiatlo N., vd., 1990).

Asidik gastrik koşullar altında ($\text{pH} < 4.5$) folik asit FBP'den ayrılır, fakat ince bağırsakta ($\text{pH} 6-7$) tekrardan bağlanmaktadır. Süt ve yoğurda FBP ilavesi folat biyoyararlanımını azaltmaktadır. FBP ilavesiz sütte, folik asit biyoyararlanımı 5-MTHF'den daha düşük bulunmaktadır (Verwei M., 2004; de Jong R.J., vd, 2005).

1.4. Bebek Beslenmesinde Folik Asit Ve Folatın Önemi

Büyüme çağındaki bebeklerde hücre sentezi hızı arttığından dolayı folik asit gereksinimi de artar (Tamura, T., vd., 1997). Folatların, bebeklerde nöral tüp defektlerinin yanında artmış plazma homosisteininin sebep olduğu hastalıkların önlenmesinde etkili olduğu bilinmektedir. Bebeklik ve büyüme hızının yüksek olduğu ergenlik döneminde yeterli folik asit alımı için kritik bir dönemdir (Tamura, T., vd., 1997; Houghton L.A., vd., 1997; VanderJagt D.J., vd., 2000). Bilişsel yeterliliğin artmasında ve belirli kanser türlerinin azaltılmasında folatın önemli rolü olduğu bildirilmiştir (Witthöft C.M., vd., 1999).

Folatlar, çeşitli hücrel reaksiyonlar için tek karbon ünitesi taşıyan faktörler olarak hareket eder. Böylece, normal hücre fonksiyonu için önemli olan DNA biyosentez döngüsüne ve metilasyon döngüsüne dahil olurlar.

Folat, çocuklarda spinabifida ve anensefali gibi nöral tüp defektleri (NTD'ler), megaloblastik anemi, kardiyovasküler hastalıklar, belirli kanserlerbazı ve ciddi hastalıkların önlenmesinde rol almaktadır. Bu işlevlerinden dolayı son zamanlarda bebek sağlığı ve beslenmesi alanında üzerinde aktif olarak çalışılan vitaminlerdendir (Shohag M.J.I., vd., 2011). Bu nedenle, bebek beslenmesinde takviye edilen vitaminlerin başında gelmektedir.

Türk Gıda Kodeksi (Tebliğ No: 2007/50) ve Avrupa Birliği Hukuku'na (2006/141 / EC sayılı Komisyon Direktifi) göre, bebek mamalarındaki folik asit için maksimum sınır $50 \mu\text{g} / 100 \text{kcal}$, ve günlük referans alımı $150 \mu\text{g}$ diyet folat eşdeğerleridir (DFE'ler).

1.5. Folik Asit Yetersizliği Sonuçları ve Takviyesi

Folatlar, DNA, RNA ve proteinlerin sentezi gibi insan vücudundaki bazı temel biyolojik süreçlere katılmaktadır. Folat eksikliği olan gebelerde prematüre doğumlar, fiziksel yetersizlik veya anensefali ve nöral tüp defektleri (NTD) ile doğumlar görülebilmektedir (Berry R.J., vd., 1999; Haslam N. ve Probert C.S., 1998; Honein M.A, vd., 2001).

Düşük veya yetersiz folat alımları, konjenital malformasyonlar ve nöral tüp defektleri, yüksek homosistein düzeyleri ve megaloblastik anemi gibi kronik bozuklukların gelişimine neden olabilmektedir (Garbis, S. D., vd., 2001).

Nöral tüp defektlerinin (Botto, L. D., ve Yang, Q., 2000; Cuskelly G.J., McNulty H. ve Scott J.M., 1996), kardiyovasküler hastalıklarının önlenmesi (Boushey C.J., vd., 1996; Graham I.A. ve O’Allaghan P., 2000) ve kolon kanseri riskinin azaltılması (Giovannucci E., vd., 1998; Rampersaud G.C., Bailey L.B., ve Kauwell G.P., 2002) yeterli folat alımı ile sağlanabilir. Bu, folat bakımından zengin gıdaların yüksek miktarda tüketilmesi veya folik asit takviye edilmiş gıda ürünlerinin alımı ile sağlanabilir (Bailey L.B., Rampersaud G.C. ve Kauwell G.P., 2003; Brouwer I.A., vd., 1999; Tamura T., 1997).

Folik asit alımının azalması ve yetersizliği kardiyovasküler hastalıklar, majör depresyon, şizofreni, alzheimer ile kolorektal, uterus, servikal, akciğer ve özofagus gibi bazı karsinomlar için artan risklere yol açmaktadır (Krishnaswamy K. ve Nair K.M., 2001; Eskes T.K., 2000; VanderJagt D.J., vd., 2000; Reynolds E.H., 2002; Antony A.C. ve Hansen D.K., 2000; Ford E.S., Byers T.E. ve Giles W.H., 1998).

Folat eksikliği nöral tüp defektlerine (NTD) neden olabileceğinden dolayı (Mulinare J., vd., 1995; Relton C.L., Pearce M.S. ve Parker L., 2005; Eichholzer M., Tönz O. ve Zimmermann R., 2006) gebelik öncesi ve gebeliğin erken evrelerinde diyetlerinde folik asit açısından zengin gıdaların alınmasına ek olarak günlük 400 µg folik asit takviyesi almaları önerilmektedir (IOM, 1998). Son yıllarda folatların nöral tüp defektlerine, koroner kalp hastalıklarına, bazı kanser türlerine ve bozulmuş bilişsel işlevlere karşı sağlığı koruma rollerine ilişkin yapılan çalışmalarda, birçok ülkede folat alımının artırılması önerilmiştir (Selhub J. ve Rosenberg I.H.1996).

NTD ve folat eksikliği arasındaki ilişkiye dair birçok güçlü kanıt nedeniyle, pek çok ülkede gıdalara folat takviyesi yapılmaktadır. 1996 yılında Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından, zenginleştirilmiş ekmek, tahıl, un, mısır unu, makarna, pirinç ve diğer tahıl ürünlerine folik asit takviyesini gerektiren düzenlemeler yayınlanmıştır (Satchell, B.F., 1996). Farklı ürünlere takviye edilen folik asit miktarı, 95 ile 309 mg / 100 g ürün arasında değişmektedir. Bu takviye aralığı, 140 µg folik asit / 100 g tahıl-tahıl ürünü hedef seviyesine göre seçilmiştir. FDA tarafından yapılan ilk tahminler, yaş ve tüketim modellerine bağlı olarak yetişkinlerde 70 ile 130 µg / 100 g arasında folat alımının artmasını beklemektedir (Food and Drug Administration, 1993).

1.6. Biyoyararlılık ve Biyoerişilebilirlik

Biyoyararlılık, genel olarak, bir besinin metabolik kullanımı, bağırsak emilimi, taşınması, metabolizması ve atılımı işlemlerini içerir (VLAG, 1997; Bouayed, J., Hoffmann, L., ve Bohn, T., 2011). Gıdalardaki besin öğeleri ve biyoaktif bileşenlerin sadece belirli bir miktarı organizma tarafından etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Fernández-García vd, 2009). Beslenme açısından bakıldığında biyoyararlılık, fizyolojik fonksiyonlarda kullanılmak veya depolanmak üzere alınan besin ve biyoaktif bileşimin fraksiyonunu ifade eder (Gharibzahedi, S. M. T. Ve Jafari, S. M. 2017) ve tüketilen besin veya besin öğesinin vücudun işlevsel olarak kullanabileceği bir oranı olarak tanımlanır (Blenford D., 1995).

Biyoyararlılık ve biyoerişilebilirlik terimleri sıklıkla birbirlerinin yerine kullanılmasına rağmen, biyoerişilebilirlik kavramı biyoyararlılığın kapsamı içerisindedir. İn vivo biyoyararlılık çalışmaları in vitro yöntemlere göre zaman, etik ve maliyet açısından daha zordur (Fernández-García E., Carvajal-Lérida I. ve Pérez-Gálvez A., 2009).

Biyoerişilebilirlik analizleri ise her türlü gıdaya uyarlanabilen genel deneysel teknikler kullanılarak yapılmaktadır. Besinlerin biyoerişilebilirlikleri genellikle gastrointestinal sistemin kompartmanları örnek alınarak hazırlanan in vitro sistemlerin kullanımı ile incelenmektedir (Sopade P.A. ve Gidley M.J. 2009). İn vitro biyoerişilebilirlik

analizleri; simüle edilmiş ağız, mide ve ince bağırsak modellerinde yapılmaktadır. Birçok çalışma, in vivo ve in vitro çalışmalar arasında iyi bir korelasyon olduğunu göstermiştir ve bu yöntemler birçok çalışmada kullanılmaktadır (Dupont D., vd., 2010; Barbé F., vd., 2013; Ménard O., vd., 2014).

1.6.1. Bebeklerin Mide pH'ları

Çalışmalar, FBP'lerin folatın taşınması ve bozulmasına karşı korunmasında etkili olduğunu göstermektedir. Folat ve folik asit FBP'ye bağlanarak taşınmaktadır. Ancak bu vitaminin vücutta kullanılabilmesi için bağlı bulunduğu FBP'den ayrılması gerekmektedir. FBP'nin folat ve folik asite bağlanma kapasitesi ortamın pH değerine bağlı olarak değişmektedir.

Yetişkin mide pH'ı 1,5 iken, bebeklerin mide pH'ları 3,5-4 arasındadır. Yaşın artmasıyla birlikte mide pH'ı düşük seviyelere gelerek mide asiditesi artmaktadır. Düşük pH'larda FBP'den folatın ayrılması yüksek pH'lara göre daha çok gerçekleşmektedir. Folatın FBP'den ayrılması farklı pH'larda farklı derecelerde olduğundan dolayı yetişkinlerde ve bebeklerde folatın biyoyararlılığı farklılık göstermektedir (Verwei M., vd., 2003).

Süt ve süt ürünlerinde bulunan folik asitin biyoyararlanımı ve biyoerişilebilirliği ile ilgili bebeklerde çok az çalışma bulunmaktadır. Bugüne kadar, takviye folik asitin biyoyararlanımı ve biyoerişilebilirliğine yönelik in vivo ve in vitro çalışmalar, sadece yetişkin gastrik pH koşullarına yönelik yapılmıştır.

1.6.2. FBP Mekanizması

Folat ve folik asitin FBP ile bağlanması sonucu vitamin, bakteriyel alım ve bozulmaya karşı korunmakta ve transportu sağlanmaktadır (Lönnerdal, B. 2003; Jones, M. L., Treloar, T., ve Nixon, P. F., 2003). FBP'ye bağlı halde bulunan folik asit vücutta kullanılamamaktadır. Vitamin, vücutta biyoyararlılık gösterebilmesi için bağlı

bulunduğu FBP'den ayrılması gerekmektedir. FBP'den ayrılarak serbest hale gelen folat vücutta kullanılabilir forma dönüştürülerek biyoyararlılık göstermektedir.

FBP'nin folat absorpsiyonu üzerindeki etkisi, gastrik pasaj sonrası folatın bağlanması ile ilişkilidir. Folatın FBP'den ayrılması 5 ve daha düşük pH'larda (Achanta, K., Boeneke, C. A., ve Aryana, K. J., 2007) meydana gelmektedir. Asidik gastrik koşullar altında (pH-4.5), folik asit, FBP'den ayrılır, fakat ince bağırsakta (pH-6-7) FBP ile tekrardan bağlanmaktadır. Gastrointestinal sistemin sonunda FBP kısmen denatüre olmakta ve folat biyoyararlılığını azaltmaktadır (Verwei M., vd., 2003).

Folat ve FBP takviyeli, pastörize edilmiş ve ultra yüksek sıcaklıkta (UHT) işlenmiş sütteki FBP mekanizması araştırılmıştır. UHT işlemi, sütte bulunan FBP'yi yok etmektedir ve sonuç olarak, folat UHT sütünde serbest formda açığa çıkmaktadır. Pastörize sütte ise FBP ısınmadan dolayı kısmen tahrip olmakta ve folatın bir kısmı FBP'ye bağlı kalmaktadır (Wigertz K., vd., 1996).

1.6.3. Folat ve Folik Asit Biyoyararlılıkları

Folatın biyoyararlanımı, diğer faktörlerin yanı sıra, doğal kaynaklarda poliglutamil formunda veya takviye edilmiş gıdalarda sentetik monoglutamil formunda olmasına bağlıdır. Poliglutamil folatlar, folik asitten farklı olarak, absorbe edilmeden önce ince bağırsakta enzimatik dekonjugasyona tabi tutulmalıdır (Ball G.F., 2005).

İnsan gastrointestinal sisteminden simüle edilen biyoerişilebilirlik çalışmaları, folik asit ve 5-MTHF takviyeli süt karşılaştırıldığında folik asitin daha düşük biyoyararlılığa sahip olduğunu bildirmektedir (Arkbage K., vd., 2003; Verwei M., vd., 2004).

Doğal gıda ürünlerinde ki yaygın folat bileşiği 5-MTHF iken, takviye edilmiş ürünlerde folik asit bulunmaktadır. Folik asit, vfolatların fizyolojik aktif formu değildir, ancak besin takviyesi olarak veya gıdaların zenginleştirilmesi amacıyla kullanılmaktadır (Breithaupt D.E., 2001; Verwei M., 2004). Gıdalarda doğal halde bulunan folat, folik asit ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksek biyoyararlılık göstermektedir. 5-MTHF, biyolojik olarak en aktif folat formudur ve folik asitin kullanılması için vücutta dönüştürülmesi gereken moleküldür. Bazı

bireylerde, folik asiti 5-MTHF'ye dönüştürmek için gerekli enzim olan metilenetetrahidrofolat redüktaz (5-MTHFR) yetersizliğine rastlanmaktadır, ancak biyoyararlılıktaki bu fark hastanın enzimatik genotipinden ayrı olarak görülmelidir (Ball, 2005).

Folat ve folik asit biyoyararlanımı, çeşitli içsel veya dışsal faktörlerden etkilenebilir. Bu faktörler, gastrointestinal sistemin fonksiyonu, yaş, cinsiyet, uyuşturucu ve alkol kullanımınıdır. Ekstrinsik faktörler ise diyetle alınan folatın çeşiti, gıda matrisi veya işleme ve depolamadır.

FBP'nin folat emilimi üzerindeki etkisi, gastrik pasaj sonrası folatın bağlanması ile ilişkilidir. Asidik gastrik koşullar altında ($\text{pH} < 4.5$), FBP'den ayrılan folik asit, ince bağırsakta ($\text{pH} 6-7$) yeniden bağlanmaktadır. Folik asit ve 5-MTHF'in gastrik pasaj sırasında FBP'ye farklı ölçülerde bağlanması ile biyoyararlılığını etkilemektedir. Gastrointestinal sistemin sonunda FBP kısmen enzimler tarafından denatüre edilmeden kalmakta ve folat biyoyararlılığını azaltmaktadır. FBP'nin bağlanma kapasitesi folik asit takviyeli süt ürünlerinde, 5-MTHF takviyeli süt ürünlerine göre daha yüksektir (Verwei M., 2004). Gastrointestinal sistemin kompartmanları örnek alınarak hazırlanan in vitro modellerde folik asit takviyeli süt ürünlerinden, ilave FBP içermeyen örneklerin biyoerişilebilirliği 5-MTHF takviyeli süt ürünlerinin biyoerişilebilirliğinden daha düşük bulunmaktadır (Verwei, M., 2003)

Dinamik bilgisayar kontrollü gastrointestinal model (TNO gastrointestinal model (TIM)) kullanılarak folat biyoerişilebilirliği incelenen bir çalışmada; hem farklı FBP konsantrasyonları hem de folik asit ve 5-MTHF ile zenginleştirilmiş ultra yüksek sıcaklıkta (UHT) işlenmiş süt ve pastörize süt kullanılmıştır. Gastrointestinal pasaj sırasında FBP stabilitesini ve FBP'nin folat biyoyararlanımı üzerindeki etkisini incelemek için FBP ilave edilmiş UHT ve pastörize süt ürünleri kullanılmıştır. UHT işlemi, FBP'yi denatüre etmekte ve folat UHT sütünde serbest formda açığa çıkmaktadır. Pastörize sütte ise FBP düşük ısı işleminden dolayı kısmen denatüre olmakta ve folatların bir kısmı FBP'ye bağlı kalmaktadır (Wigertz K., vd., 1996). Folat biyoerişilebilirliği ve FBP stabilitesi, gastrointestinal sistem örnek alınarak hazırlanan bu in vitro modelde biyoerişilebilirlik analizleri; folik asit, folat ve FBP konsantrasyonları ölçülerek yapılmıştır. Folik asit takviyeli süt ürünlerinden ilave FBP içermeyen örneklerin biyoerişilebilirliği; 5-MTHF takviyeli süt ürünlerinden daha

düşük bulunmuştur. Folik asit takviyeli süte, FBP takviyesi folat biyoerişilebilirliğini azaltmıştır. Bu çalışmada süt folat için uygun bir taşıyıcı gibi görünmektedir, çünkü hem folik asit hem de 5-MTHF matriksten kolayca salınmakta ve emilebilmektedir. Ancak, sonuçlar folik asitin ince bağırsaktan geçişi sırasında FBP'ye kısmen bağlı kaldığını ve folik asitin biyoerişilebilirliğini azalttığını göstermektedir (Verwei M., vd., 2003).

FBP'nin folat biyoyararlanımındaki rolü; folatı bakteriyel alım, bozulmaya karşı korumasının yanında (Nygren, L., Sternesjö, Å., ve Björck, L., 2003) plazmada folatı taşımasından sorumludur (Nygren-Babol, L., ve Jägerstad, M., 2012). FBP'nin folat emilimi üzerindeki etkisi; gastrik pasaj sonrası folatın bağlanması ile olmaktadır. (Lönnerdal, B., 2003; Jones, M. L., Treloar, T., ve Nixon, P. F., 2003; Picciano, M. F., vd., 2004; Donovan, S. M., 2006). FBP'nin folik asit emilimi üzerine etkisi, inek sütünde FBP'ye bağlı folik asit ve serbest folik asit verilen sıçanlarda araştırılmıştır. Asidik gastrik koşullar altında (pH<4.5) folik asit, FBP'den ayrılmakta ve ince bağırsakta (pH 6-7) yeniden bağlanmaktadır. Folik asitin ince bağırsakta yeniden bağlanması biyoyararlılığını düşürmektedir (Picciano, M. F., vd., 2004). İn vitro dinamik gastrointestinal model kullanılarak yapılan bir çalışmada ise, FBP'nin gastrointestinal sistemde kısmen denatüre olduğunu ve folat biyoerişilebilirliğini azalttığını göstermektedir (Verwei M., vd., 2013; Arkbåge K., Verwei M. ve Havenaar R., 2003). Folik asit ve 5-MTHF'in FBP'ye bağlanma dereceleri ve gastrik pasaj sırasında folat bağlanmasına FBP stabilitesine etkisi araştırılmıştır. Folik asit ve 5-MTHF, FBP'ye farklı ölçüde bağlanmaktadır. Folik asit takviyeli süt ürünlerinde FBP'ye bağlanma daha çok olmakta ve 5-MTHF takviyeli süt ürünleri ile karşılaştırıldığında biyoyararlılıkları daha düşük bulunmuştur (Verwei M. vd., 2004).

Asidik gastrik koşullar altında (pH<4.5), folik asit, FBP'den ayrılır ve ince bağırsakta (pH-6-7) FBP ile tekrardan bağlanır. İn vitro çalışmalar, süt ve yoğurda FBP ilavesinin folat biyoyararlanımını azalttığını göstermektedir. Süte FBP ilavesi yapılmadan, folik asit ve 5-MTHF biyoerişilebilirliği azalmış ve folik asit biyoerişilebilirliği 5-MTHF'den daha düşük bulunmuştur. Bir başka çalışmada, pastörize sütte 5-MTHF biyoerişilebilirliği FBP'den etkilenmemiş ancak folik asit biyoerişilebilirliği FBP ilavesiyle azalmıştır (Verwei M., 2004).

Folik asit emilimi çoğunlukla ince bağırsağın jejunum kısmında gerçekleşir ve emilim pH 6,3'te en belirgin şekilde etkilenmektedir. Folatlar, bağırsak mukozasından geçerken ya da folatların depolama organı olan karaciğerin geçişi sırasında indirgenerek ve metillenir. Tüm hücre içi folatlar, poliglutamil formunda bulunurken, plazmada taşınanlar metillenmiş monoglutamil formunda bulunurlar (Scaglione, F. ve Panzavolta, G. 2014).

Folat biyoyararlanımı, diyetle alınan folata, gıda matrisine veya işleme ve depolamaya bağlıdır. Biyoyararlılık; gastrointestinal sistem fonksiyonundan, yaş, cinsiyet ve alkol kullanımından da etkilenmektedir. (Parada, J., ve Aguilera, J. M., 2007; Villanueva, J. A., ve Halsted, C. H., 2004;Boeneke, C. A., & Aryana, K. J., 2008) Folat biyoyararlanımına ilişkin en son teknolojiyi özetleyen çalışmada; pteroil poliglutamatlar (folatlar) neredeyse tamamen emilirken, sentetik pteroil monoglutamik asit (folik asit) daha az biyoyararlılık göstermektedir (% 50-80). (Clifford A.J., Jones A.D. ve Bills N.D., 1990; Clifford A.J., 1991).

FBP'nin folat biyoyararlılığı üzerindeki rolünü araştıran in vivo çalışmaların çoğu hayvanlar üzerinde gerçekleştirilmiştir (Parodi P.W., 1997; Donovan, S. M., 2006; Nygren, L., Sternesjö, Å., ve Björck, L., 2003; Picciano, M. F., vd., 2004; Swiatlo N., vd., 1990). Yapılan çalışmalar, anne sütü ile beslenen bebeklerin, biberonla beslenen bebeklerden daha iyi folat düzeylerine sahip olduğunu göstermektedir (Sweeney, M. R. Vd., 2005; Engbersen A.M., vd., 1995; Wigertz K., 1997; Witthöft, C.M., vd., 1999).

İKİNCİ BÖLÜM

MATERYAL VE METOT

Çalışma İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi AR-GE Laboratuvarında Haziran 2018'de yapılmıştır. Çalışmada kullanılan maddeler ve metotlar aşağıda yer almaktadır.

2.1. Kimyasallar

Çalışmada yer alan kimyasallar: Askorbik asit (AA), asetonitril (ACN), potasyum dihidrojen fosfat (KH₂P₀₄), sodyum klorür (NaCl), asetik asit (ACS reaktifi, ≥% 99.7), alfa-amilaz (*Aspergillus oryzae* tozu, 1.5 U / mg) ve pankreatin (domuz pankreasından 8x USP spesifikasyonlarından) Sigma'dan (St. Louis, MO, ABD) elde edildi. Proteaz (*Bacillus licheniformis* kaynaklı 350 subtilisin A, 350 U / ml) Megazyme'den (UK) elde edildi. Folik asit (% 96-102, saf) Acros Organics'ten (New Jersey, ABD). Katı faz ekstraksiyon (SPE) kolonu (Bond Elut SAX, 500 mg, 3 mi), Agilent Technologies'den (CA, ABD) elde edildi ve folik asidin saflaştırılması için kullanıldı. Bu çalışmada, diğer tüm kimyasallar yüksek saflıkta kullanıldı.

2.2. Numuneler

Bu çalışmaya üç grup folik asit kaynaklı bebek ek gıdası ve maması dahil edildi. Örneklem; 3 farklı marka devam sütü, 3 farklı marka süt bazlı bebek maması ve süt tozu ile formüle edilmiş 8 farklı tahıl bazlı bebek ek gıdasından oluşmaktaydı. Bu mamalar İstanbul'daki farklı marketlerden satın alındı. Bebek maması içerikleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

2.3. Solüsyon ve Standartların Hazırlanması

Fosfat Tampon Çözeltisi (0,1 M): 1 L'lik balon jojeye 13,6 g potasyum dihidrojen fosfat ve 1 g L-askorbik asit tartıldı, hacim deiyonize suyla tamamlandı ve pH 7,5'e ayarlanarak hazırlandı.

Sodyum asetat (0.1 M) içeren çözelti, aşağıdaki şekilde yapıldı: 0.82 g sodyum asetat, 10 g sodyum klorit ve 1 g askorbik asit, 100 ml'lik bir erlene tartıldı. Karışım deiyonize suda çözüldü. Daha sonra 1 M NaOH ile pH 4.5'e ayarlandı ve hacim deiyonize su ile tamamlandı. Tampon çözeltisinin deiyonize su ile seyreltilmesiyle SAX kolon şartlandırma tampon çözeltisi (0.01 M) hazırlandı ve pH tekrar 7.2'ye ayarlandı.

Standartların Hazırlanması: Folik asidin standart stok çözeltisi (100 µg/ml): 100 ml'lik balon jojeye 10 mg 5-metiltetrahidrofolat standardı tartıldı, 10-15 ml fosfat tampon ile çözüldürülerek hacimine tamamlandı. Çalışmalarda stok standarttan gerekli seyreltmeler yapılarak çalışma standartları hazırlandı.

Sodyum Hidroksit Çözeltisi (%20): 100 ml'lik balon jojeye 20 g sodyum hidroksit tartıldı ve su veya buz banyosunun içinde çözüldürülerek hacimine deiyonize suyla tamamlandı.

Hidroklorik Asit Çözeltisi (0,1 N): 1 L'lik balon jojeye 8,28 ml hidroklorik asit eklendi, hacim deiyonize suyun üzerine hidroklorik asidin yavaşça eklenmesiyle tamamlandı.

2.4. Folik Asit Ekstraksiyonu metodu

Folik asit ekstraksiyon yöntemleri, (Rychlika, vd., 2007) metodundan bazı modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır. Çalışmamızda doğal folatlar analiz edilmediğinden sıçan plazması ve tavuk pankreası dekonjugasyon enzimi olarak kullanılmamıştır. Bu çalışmada folik asidin ekstraksiyonu için iki farklı yöntem yer almıştır. İlk yöntemde, proteaz ve alfa amilaz, bir di-enzim uygulaması olarak, ikinci yöntemde ise sadece pankreatin kullanılmıştır.

İlk yöntem şu şekildedir: 100 ml'lik erlenlere bebek sütünden 10 ml , bebek mamasından ve tahıl bazlı ek gıdadan 2'şer g ayrı ayrı tartılmıştır. Daha sonra, her bir

erlene 40 ml fosfat tamponu (0.1 M) çözeltisi ilave edildi ve karışım manyetik bir karıştırıcıda 10 dakika karıştırılmıştır. Oksitlenmeyi önlemek için, yaklaşık 25 µl 2-merkaptoetanol eklenmiştir. Hazırlanan karışıma 0.1 ml alfa amilaz enzimi ilave edildi ve 2 saat süre ile 37 °C'de çalkalamalı suyu banyosunda inkübe edildi ve daha sonra enzim 10 dakika boyunca 100 °C'de su banyosunda denatüre edilmiştir. Örnekler oda sıcaklığına soğutulduktan sonra, 0.2 ml proteaz ilave edilmiş ve numuneler, 2 saat boyunca 37 °C'de çalkalayıcı su banyosunda tekrar inkübe edilmiştir. Enzim denatürasyonu sağlamak için, 10 dakika boyunca 100 °C'de su banyosunda bekletilmiştir. Oda sıcaklığına soğutulduktan sonra, son hacim fosfat tampon çözeltisi ile 50 ml'ye tamamlanmıştır. Numuneler, 50 ml Falcon tüplerine aktarılmıştır, 4000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve 0.45 mikron selüloz-asetat (CA) filtresinden süzölmüştür. Daha sonra üst faz SAX kolonu ile saflaştırılmıştır.

2.5. Pankreatin Metodu Optimizasyonu

İlk yöntemden farklı olarak, bir enzim karışımı olan pankreatin, ikinci yöntemde kullanıldı ve enzimatik inkübasyon, tek bir aşamada gerçekleştirildi. Bu çalışmada metot optimizasyonu için sertifikalı referans materyali (Standart Referans Materyali 1846: Bebek Formülü) kullanıldı. Uygun enzim miktarını belirlemek için farklı miktarlarda pankreatin (0.25, 0.5, 1 ve 2 g) eklendi.

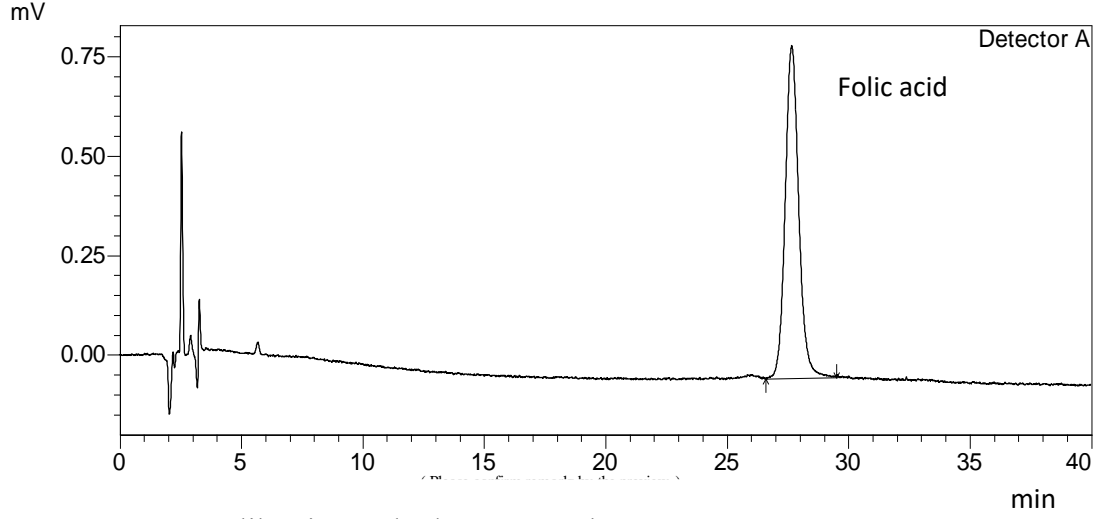
Pankreatin enzimi kullanarak örneklerde bulunan folik asit miktarını belirlediğimiz bu metotta: 100 ml'lik erlenlere 10 ml süt örneği, 2 g bebek maması ve 2 g tahıl bazlı ek gıdası ayrı ayrı tartıldı. Tüm örnekler 6 ml askorbik asit eklendi ve 10 dakika karıştırıldı. Daha sonra, her bir erlene 15 ml fosfat tamponu (0.1 M) çözeltisi ilave edildi ve karışım manyetik bir karıştırıcıda 10 dakika karıştırıldı. Karışımın pH'ı 1M NaOH ile 7,2'ye ayarlandı. Hazırlanan karışıma pankreatin ilave edildi ve 2 saat süre ile 37 °C'de çalkalamalı suyu banyosunda inkübe edildi. Daha sonra enzim 10 dakika boyunca 100 °C'de su banyosunda bekletilerek denatüre edildi. Oda sıcaklığına soğutulduktan sonra, son hacim fosfat tampon çözeltisi ile 50 ml'ye tamamlandı. Numuneler, 50 ml Falcon tüplerine aktarıldı, 4000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlendi ve 0.45 mikron selüloz-asetat (CA) filtresinden süzöldü. Daha sonra üst faz, bir SAX kolonu ile saflaştırıldı.

2.6. SAX kolonu ile numunelerin saflaştırılması

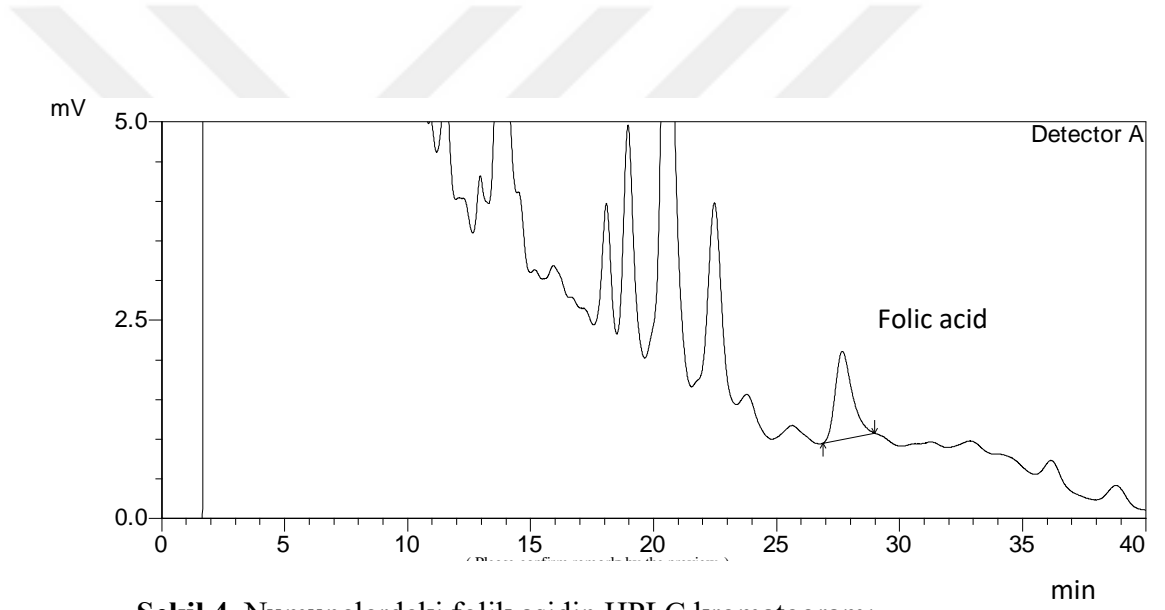
SAX kolon, sırasıyla 5 ml metanol ve 5 ml 0.01 M fosfat tampon çözeltisi ile şartlandırıldı. Daha sonra, SAX kolonuna filtre edilmiş süpernatant çözeltisinden 5 ml eklendi. Kolona eklenen numune, vakum pompası ile dakikada 1 ml'lik bir geçecek şekilde ayarlandı. Numune geçirildikten sonra kolon yıkaması, 10 ml 0.01 M fosfat tampon çözeltisi kullanılarak gerçekleştirildi. Bu adımdan sonra, folik asidi toplamak için kolona yavaş yavaş 2 ml folik asit yürütme çözeltisi ilave edildi ve vakum pompası, numuneyi dakikada 0.3 ml akış hızında çıkartarak şekilde ayarlandı ve bir test tüpü içine toplandı. Örnek 0.45 µm bir CA filtreden süzüldü ve analize kadar -20 °C'de saklandı.

2.7. Kromatografik Koşullar

Bebek gıdalarında folik asidin miktarı, ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanılarak belirlendi. Vahteristo ve diğ. (1996) tarafından önerilen yöntemde bazı değişiklikler yapılarak kullanıldı. HPLC sistemi, bir Shimadzu RF-10AXL UV-Vis dedektör ile (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonya) Shimadzu LC 20AT pompadan oluşmuştur Mobil faz, 0.33 M tampon çözeltisi içinde % 8 ACN ile hazırlandı. Mobil fazın pH'ı ortofosforik asit ile 2.4'e ayarlandı. Daha sonra 0.22 mikron filtre kağıdı kullanılarak vakum altında süzüldü. Folik asit UV-Vis detektörde dalga boyu 290 nm'de tespit edildi. Folik asidin ayrılması için Zorbax SB-C8 4.6 x 250 mm 5 µm kolon(Agilent, ABD) kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 30 °C'ye sabitlendi ve akış hızı 1 ml/dakikaya ayarlandı. Enjeksiyon hacmi, 20 µl'ye ayarlandı ve 40 dakikada ayırma işlemi tamamlandı. Bebek ve yetişkin besin formülasyonlarında (referans materyal) folik asitin HPLC kromatogramları sırasıyla Şekil 4 ve Şekil 5'te gösterilmektedir.



Şekil 3. Folik asit standardının HPLC kromatogramı.



Şekil 4. Numunelerdeki folik asidin HPLC kromatogramı

2.8. Miktar ve Kalite Kontrolü

Folik asidin miktarının belirlenmesi HPLC’de folik asite karşılık gelen pik alanının hesaplanması ile gerçekleştirildi.. Çalışmada, yöntemin doğruluğunu ve performansını kontrol etmek için sertifikalı referans materyali (Standart Referans Materyali 1846: Infant Formülü) kullanıldı. Aynı zamanda, FAPAS (İngiltere'deki Gıda Analizi Performans Değerlendirme Şeması) tarafından düzenlenen yeterlilik testine katılarak kahvaltılık gevrek içinde folik asit miktarı analiz edildi. Tüm analizler üç kez tekrarlanarak yapıldı ve ortalama değer kullanıldı.

2.9. Folik asidin in vitro gastrointestinal sistem metodu ve biyoerişilebilirlik analizi

Yaptığımız çalışmada, test örneklerinde folik asidin biyoerişilebilirliği insan sindirim sistemi simüle edilerek incelendi. Metotta uygun PH'larda ağız, mide ve ince bağırsak ortamı oluşturuldu ve her bir ortam için uygun enzim hazırlandı.

2.9.1. Sindirim enzimleri ve diğer çözeltiler (organik, inorganik)

Bu in vitro sistemde ağız, mide, ince bağırsak ortamı hazırlandı.

Ağız ortamı: 1.7 mL NaCl (175.3 g/L), 8 ml üre (25 g/L), 15 g ürik asit, 280 mg a-amilaz ve 25 mg müsin, 500 ml'lik bir erlende deiyonize su ile çözüldü. Daha sonra hacim deiyonize su ile tamamlandı ve pH yaklaşık 6.8 ± 0.2 'e ayarlandı. pH istenen değerde değilse, HCl veya NaOH çözeltisi kullanılarak istenilen aralığa getirildi.

Bebek mide ortamı: 6.5 ml HCl (37 g/L), 18 ml CaCl₂.H₂O (22 g/L), 1 g sığır serumu albümini, 2.5 g pepsin ve 3 g musin, 500 ml'lik bir erlen içerisinde deiyonize su ile çözüldürüldü. Daha sonra, hacim deiyonize su ile tamamlandı ve pH 4'e (± 0.02) getirildi. pH istenen aralıkta değilse, HCl veya NaOH çözeltisi ile ayarlandı.

Yetişkin mide ortamı: 6.5 ml HCl (37 g/L), 18 ml CaCl₂.H₂O (22 g/L), 1 g sığır serumu albümini, 2.5 g pepsin ve 3 g musin, 500 ml'lik bir erlen içerisinde deiyonize su ile çözüldürüldü. Daha sonra, hacim deiyonize su ile tamamlandı ve pH 1.5'a (± 0.02) getirildi. pH istenen aralıkta değilse, HCl veya NaOH çözeltisi ile ayarlandı.

İnce bağırsak ortamı: 6.3 ml KCl (89.6 g/L), 9 ml CaCl₂.2H₂O (22.2 g/L), 2 g sığır serum albümini, 1 g pankreatin ve 1.5 g lipaz, deiyonize su ile 500 ml'lik bir erlen içerisinde çözüldü. Hacim deiyonize su ile tamamlandı ve pH 8.0 ± 0.2 'e ayarlandı. pH istenilen değerde değilse, HCl veya NaOH çözeltisi ile ayarlandı.

Safra solüsyonu: 68.3 ml NaHC₃ (84.7 g/L), 10 ml CaCl₂.2H₂O (22.2 g/L), 1.8 g sığır serum albümini ve 30 g safra, 500 ml'lik bir erlende deiyonize su ile çözdürüldü. Daha sonra hacim, deiyonize su ile tamamlandı ve pH 7.0 ± 0.2 'ye ayarlandı.

2.9.2. İn vitro sindirim prosedürü

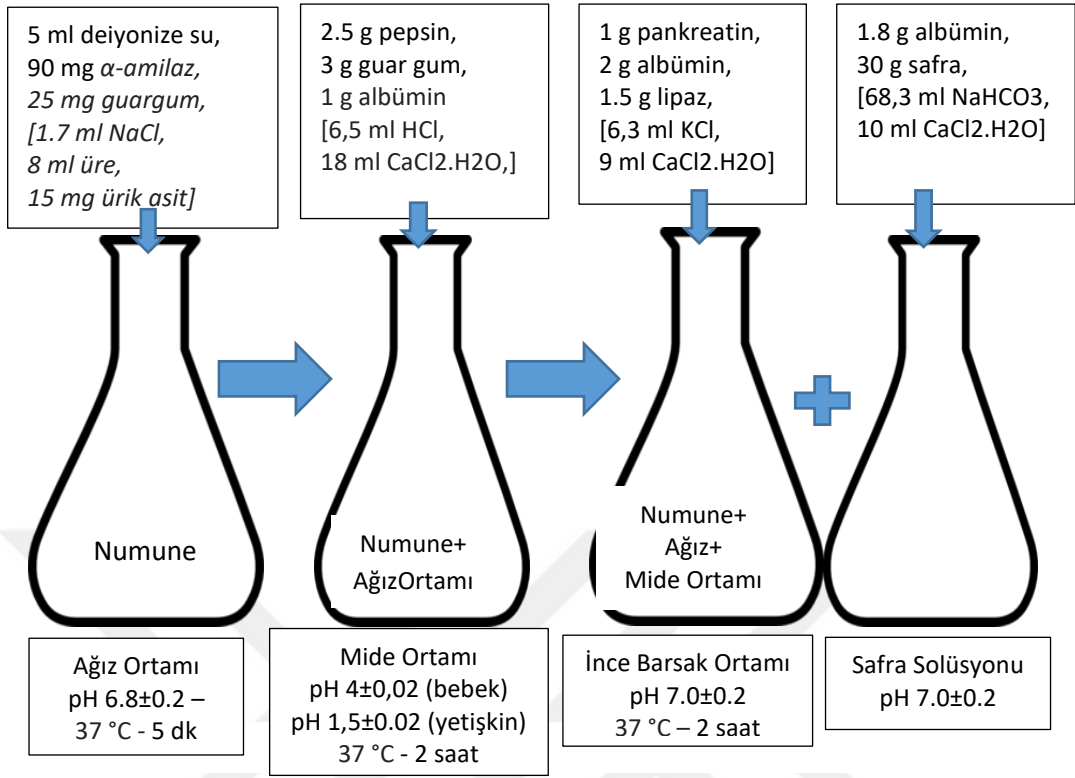
100 ml'lik erlenlere örneklerden 5'er gram tartıldı ve sıra ile ağız, mide ve ince bağırsak ortamı solüsyonları ilave edilerek in vitro ortamda sindirim gerçekleştirildi.

Ağız ortamında; 100 ml'lik bir beher içerisinde 5 gram tartılan örneklerin üzerine, hazırladığımız ağız solüsyonundan 5 ml eklenerek karıştırıldı ve daha sonra 30 saniye boyunca vorteks ile karıştırıldı ve homojen hale getirildi. Daha sonra bu karışım 5 dakika boyunca 37 °C'de çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi.

Mide ortamında; ağız ortamından gelen karışıma 12 ml mide solüsyonu ilave edildi. Bu karışım, 30 saniye boyunca bir vorteks ile karıştırıldı ve 2 saat boyunca 37 ° C'de çalkalamalı su banyosunda tekrar inkübe edildi.

İnce bağırsak ortamında; mide ortamından sonra elde edilen karışıma 10 ml ince bağırsak solüsyonu ve 5 ml safra solüsyonu eklendi. Bu karışım, 2 saat süre ile 37°C'de tekrar çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi. Sindirim işlemi tamamlandıktan sonra, son hacim, 50 ml'ye deiyonize su ile tamamlanarak seyreltildi. Daha sonra numuneler 8000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi ve 0.22 mikron CA filtreden süzüldü ve analiz edilene kadar -80 ° C'de dondurucuda saklandı.

İn vitro sindirimin sonunda alınan süzüntüden normal folik asit analizinde olduğu gibi saflaştırma yapıldı. Saflaştırma prosedürü bölüm 2.6'da verilmiştir.



Şekil 5. İn vitro gastrointestinal sindirim sistemi metodu

2.10. İstatistiksel analiz

Tüm analizler üç kez yapıldı ve ortalama değer kullanıldı. Uygulamalar arasındaki önemli farklılıklar tek yönlü varyans analizi ile istatistiksel olarak değerlendirildi (ANOVA $p < 0.05$, Tukey testi).

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR

Bebek mamaları, devam sütleri ve tahıl bazlı bebek ek gıdalarında, etikette yazan folik asit miktarı ve çalışma sonucunda bulunan folik asit miktarları Tablo 2’de gösterilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi bebek mamalarındaki folik asit miktarları $83.3 \pm 3,2 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ ile $130.3 \pm 4 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ arasında; devam sütlerindeki folik asit miktarları $15 \pm 1,5 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ ile $30 \pm 2,5 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ arasında; tahıl bazlı bebek ek gıdalarındaki folik asit miktarları ise $61.3 \pm 5.0 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ ile $138.7 \pm 5,5 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ arasında değişmektedir,

Etiket üzerindeki folik asit miktarları ve çalışmada bulunan folik asit miktarı yüzde sapmaları değerlendirildiğinde bebek mamalarındaki sapma %109,6 ile %235,3 arasında; devam sütlerindeki sapma %85,2 ile %202,2 arasında; tahıl bazlı bebek ek gıdalarındaki sapma ise %122,7 ile %252,1 arasında değişmektedir,

3.1. Bebek Ek Gıdalarındaki Folik Asit İçeriği

Tablo 1. Etiket Değerleri

Ürün Tipi	Ürün İçeriği	Etiket $\mu\text{g}/100\text{ g}$	Bulunan Değer $\mu\text{g}/100\text{ g}$	% Etiket Sapma
Bebek Maması 1 (0-6 ay)	Süt tozu	76	83.3 \pm 3.2	109,6 \pm 4,2
Bebek Maması 2 (2. aydan itibaren)	Süt tozu	55,4	130.3 \pm 4	235,3 \pm 8,1
Bebek Maması 3 (6. aydan itibaren)	Süt tozu	70	90.3 \pm 4.5	129,0 \pm 5,8
Devam Sütü 1	UHT süt	15	30 \pm 2.5	202,2 \pm 16,8
Devam Sütü 2	UHT süt	18	15 \pm 1.5	85,2 \pm 8,5
Devam Sütü 3	UHT süt	15	22 \pm 1.0	146,7 \pm 6,7
Tahıl Bazlı Bebek Ek Gıdası 1 (6-36 ay)	Tahıl + Süt tozu	70	130.0 \pm 5.5	185,7 \pm 7,1
Tahıl Bazlı Bebek Ek Gıdası 2 (2. aydan itibaren)	Tahıl + Süt tozu	50	61.3 \pm 5.0	122,7 \pm 10,1
Tahıl Bazlı Bebek Ek Gıdası 3 (6-36 ay)	Tahıl + Süt tozu	50	105.3 \pm 5.0	210,7 \pm 10,1
Tahıl Bazlı Bebek Ek Gıdası 4 (6-36 ay)	Tahıl + Süt tozu	55	138.7 \pm 5.5	252,1 \pm 10,0
Tahıl Bazlı Bebek Ek Gıdası 5 (6-36 ay)	Tahıl + Süt tozu	70	137.3 \pm 4.2	196,2 \pm 5,9
Tahıl Bazlı Bebek Ek Gıdası 6 (6-36 ay)	Tahıl + Süt tozu	70	124.3 \pm 5.5	177,6 \pm 7,9
Tahıl Bazlı Bebek Ek Gıdası 7 (6-36 ay)	Tahıl + Süt tozu	68,9	95.0 \pm 3.6	137,9 \pm 5,2
Tahıl Bazlı Bebek Ek Gıdası 8 (6-36 ay)	Tahıl + Süt tozu	55,4	73.7 \pm 5.9	133,0 \pm 10,6

Tablo 2. pH 1.5 ve pH 4 Biyoerişilebilirlik Kıyaslamaları

Ürün Tipi	Gerçek Değer µg/100 g	pH 1.5 µg/100 g	pH 4 µg/100 g
Bebek Maması 1 (0-6 ay)	83.3±3.2	48.3±2.5	29.0±2.6
Bebek Maması 2 (2. aydan itibaren)	130.3±4	92.7±3.5	51.7±4.5
Bebek Maması 3 (6. aydan itibaren)	90.3±4.5	50.7±2.5	44.0±3.5
Devam Sütü 1	30±2.5	13±1.5	11.7±2.1
Devam Sütü 2	15±1.5	10±1.2	8.7±1.2
Devam Sütü 3	22±1.0	11±1.5	10.0±2.0
Tahıl Bazlı Bebek Ek Gıdası 1 (6-36 ay)	130.0±5.5	100.0±3.6	87.7±4.2
Tahıl Bazlı Bebek Ek Gıdası 2 (2. aydan itibaren)	61.3±5.0	38.3±2.1	20.7±2.1
Tahıl Bazlı Bebek Ek Gıdası 3 (6-36 ay)	105.3±5.0	82.0±1.7	69.0±3.0
Tahıl Bazlı Bebek Ek Gıdası 4 (6-36 ay)	138.7±5.5	83.3±2.5	50.0±4.0
Tahıl Bazlı Bebek Ek Gıdası 5 (6-36 ay)	137.3±4.2	91.0±3.5	80.7±3.1
Tahıl Bazlı Bebek Ek Gıdası 6 (6-36 ay)	124.3±5.5	80.3±2.5	65.0±2.6
Tahıl Bazlı Bebek Ek Gıdası 7 (6-36 ay)	95.0±3.6	69.0±3.6	53.7±3.2
Tahıl Bazlı Bebek Ek Gıdası 8 (6-36 ay)	73.7±5.9	43.7±3.5	22.7±2.5

3.2. İn Vitro Biyoerişilebilirlik Analizleri

Bebek mamaları, devam sütleri ve tahıl bazlı bebek ek gıdalarındaki folik asidin in vitro sindirim öncesi ve sonrası bulunan miktarları mTablo 3'te özetlenmiştir. Tablo 3'te görüldüğü gibi süt tozu içeren bebek mamalarında in vitro sindirim öncesi en düşük folik asit miktarı bebek maması 1'de $83,3 \pm 3,2$ $\mu\text{g}/100$ g, en yüksek bebek maması 2'de $130,3 \pm 3,4$ $\mu\text{g}/100$ g'dır. İn vitro sindirim sonrası pH 1,5'da en düşük folik asit miktarı bebek maması 3'te $56 \pm 2,5$ $\mu\text{g}/100$ g, en yüksek bebek maması 2'de $71 \pm 3,5$ $\mu\text{g}/100$ g'dır. İn vitro sindirim sonrası pH 4'te folik asit miktarı en düşük bebek maması 1'de $29,0 \pm 2,6$ $\mu\text{g}/100$ g, en yüksek bebek maması 2'de $51,7 \pm 4,5$ $\mu\text{g}/100$ g'dır

Tablo 3'te görüldüğü gibi UHT süt içeren devam sütlerinde in vitro sindirim öncesi folik asit miktarı en düşük devam sütü 2'de $15 \pm 1,5$ $\mu\text{g}/100$ g, en yüksek devam sütü 1'de $30,3 \pm 2,5$ $\mu\text{g}/100$ g'dır. İn vitro sindirim sonrası pH 1,5'da en düşük folik asit miktarı devam sütü 2'de $10 \pm 1,2$ $\mu\text{g}/100$ g, en yüksek devam sütü 3'te $13 \pm 1,5$ $\mu\text{g}/100$ g'dır. İn vitro sindirim sonrası pH 4'te en düşük folik asit miktarı devam sütü 2'de $8,7 \pm 1,2$ $\mu\text{g}/100$ g, en yüksek devam sütü 1'de $11,7 \pm 2,1$ $\mu\text{g}/100$ g'dır.

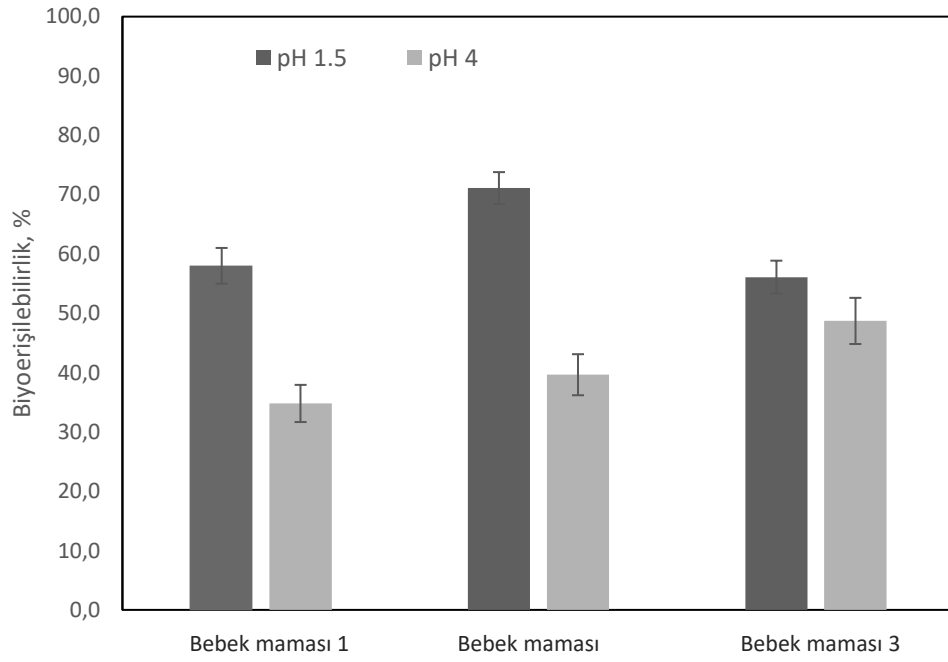
Tablo 3'te görüldüğü gibi tahıl ve süt tozu içeren bebek ek gıdalarında in vitro sindirim öncesi en düşük folik asit miktarı tahıl bazlı bebek ek gıdası 2'de $61,3 \pm 5,0$ $\mu\text{g}/100$ g, en yüksek devam sütü 1'de $30,3 \pm 2,5$ $\mu\text{g}/100$ g'dır. İn vitro sindirim sonrası pH 1,5'da en düşük folik asit miktarı tahıl bazlı bebek ek gıdası 2'de $38,3 \pm 2,1$ $\mu\text{g}/100$ g, en yüksek tahıl bazlı bebek ek gıdası 1'de $100,0 \pm 3,6$ $\mu\text{g}/100$ g'dır. İn vitro sindirim sonrası pH 4'te en düşük folik asit miktarı tahıl bazlı bebek ek gıdası 2'de $20,7 \pm 2,1$ $\mu\text{g}/100$ g, en yüksek tahıl bazlı bebek ek gıdası 1'de $88,7 \pm 4,2$ $\mu\text{g}/100$ g'dır.

Çalışmada kullanılan numunelerin in vitro sindirim öncesi hesaplanan folik asit miktarları ile ağız, mide (pH 1.5 ve pH 4) ve ince bağırsaklar dahil olmak üzere bir in vitro gastrointestinal sistem sonrası folik asit biyoerişilebilirlikleri yüzde olarak Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 3. pH 1.5 ve pH 4 Biyoerişilebilirlik Yüzdeleri

Ürün Tipi	Gerçek Değer	Gastrik pH 1.5	Gastrik pH 4
	µg/100 g	% Biyoerişilebilirlik	% Biyoerişilebilirlik
Bebek Maması 1 (0-6 ay)	83.3±3.2	58±2,5	35±2,6
Bebek Maması 2 (2. aydan itibaren)	130.3±4	71±3,5	40±4,5
Bebek Maması 3 (6. aydan itibaren)	90.3±4.5	56±2,5	49±3,5
Devam Sütü 1	30±2.5	42±3,6	38±4,2
Devam Sütü 2	15±1.5	67±2,1	57±2,1
Devam Sütü 3	22±1.0	52±1,7	45±3,0
Tahıl Bazlı Bebek Ek Gıdası 1 (6-36 ay)	130.0±5.5	77±2,5	67±4,0
Tahıl Bazlı Bebek Ek Gıdası 2 (2. aydan itibaren)	61.3±5.0	63±3,5	34±3,1
Tahıl Bazlı Bebek Ek Gıdası 3 (6-36 ay)	105.3±5.0	78±2,5	66±2,6
Tahıl Bazlı Bebek Ek Gıdası 4 (6-36 ay)	138.7±5.5	60±3,6	36±3,2
Tahıl Bazlı Bebek Ek Gıdası 5 (6-36 ay)	137.3±4.2	66±3,5	59±2,5
Tahıl Bazlı Bebek Ek Gıdası 6 (6-36 ay)	124.3±5.5	65±1,5	52±2,1
Tahıl Bazlı Bebek Ek Gıdası 7 (6-36 ay)	95.0±3.6	73±1,2	56±1,2
Tahıl Bazlı Bebek Ek Gıdası 8 (6-36 ay)	73.7±5.9	59±1,5	31±2,0

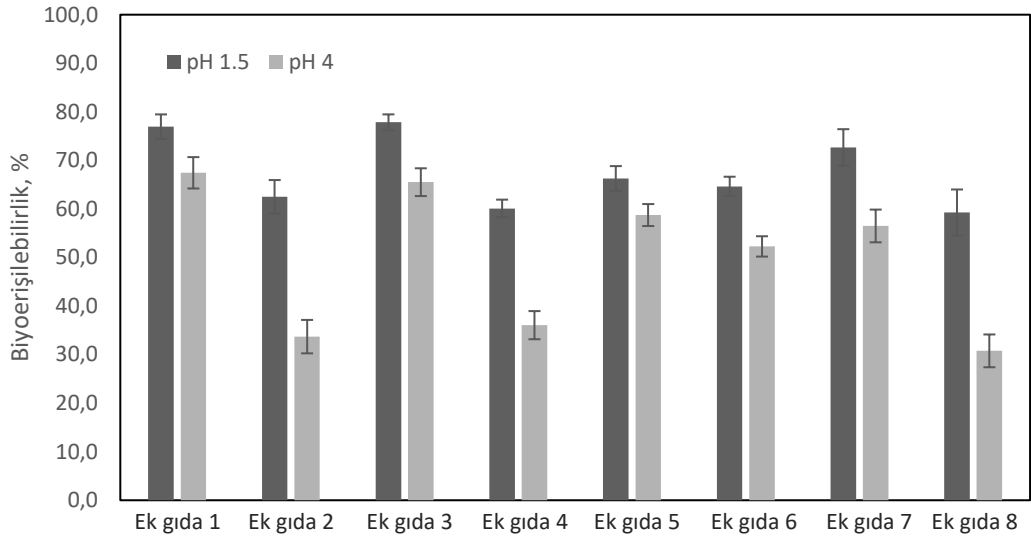
Tablo 4'te görüldüğü gibi, bir bebek maması mide pH'ı 1.5 iken, folik asidin biyoerişilebilirliğinin tüm numunelerde % 56-71 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Ayrıca, mide pH'ı 4 iken, folik asidin biyoerişilebilirliği tüm örneklerde daha da azalarak % 35-49 arasında değişmiştir. Sonuçlarda gözlemlendiği gibi, folik asidin biyoerişilebilirliği her iki mide pH'ında düşmesine rağmen, en yüksek düşüş mide pH'ı 4'te gözlenmiştir.



Şekil 6. Bebek mamalarındaki folik asidin biyoerişilebilirliği

(Biyoerişilebilirlik, sindirimden sonraki değerlerin sindirimden önce elde edilen değerlere oranı ile belirlendi)

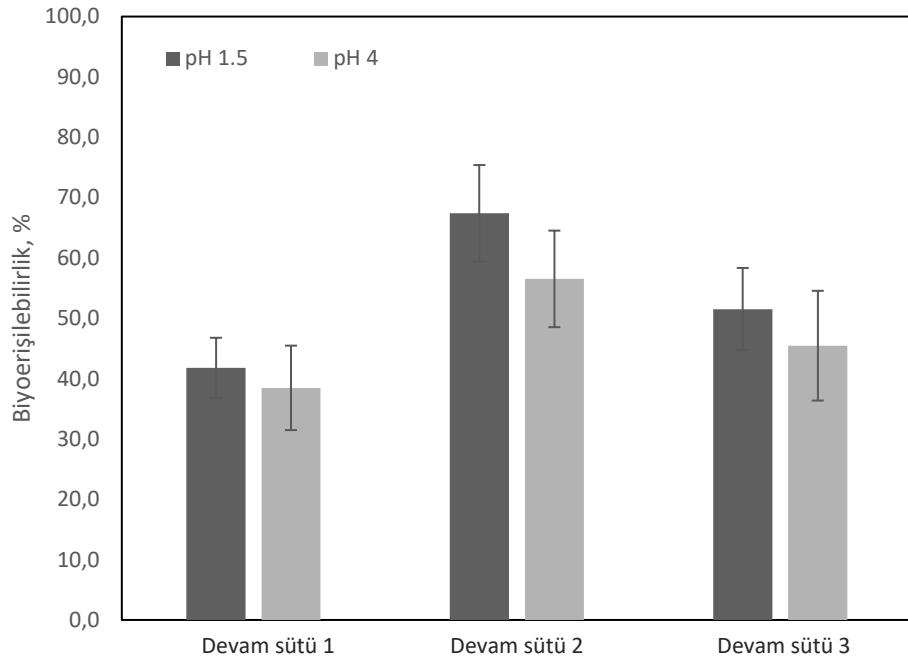
Tahıl bazlı bebek ek gıdalarındaki ilave folik asidin in vitro biyoerişilebilirliğindeki değişiklikler Tablo 4’te gösterilmektedir. Mide pH değeri 1.5 iken, folik asidin biyoerişilebilirliği örneklerde % 60-78 arasında değişmektedir. Mide pH’ının 4 olması durumunda folik asidin biyoerişilebilirliğinin tüm örneklerde önemli ölçüde azalarak % 31-67 arasında değiştiği bulunmuştur. Görüldüğü gibi, her iki mide pH’ında folik asidin biyoerişilebilirliğinde bir düşüş olmasına rağmen, en yüksek düşüş mide pH 4’te gözlenmiştir.



Şekil 7. Tahıl bazlı bebek ek gıdalarındaki folik asidin biyoerişilebilirliği

(Biyoerişilebilirlik, sindirimden sonraki değer in sindirimden önce elde edilen değere oranı ile belirlendi.)

Devam sütlerinde takviye edilmiş folik asidin in vitro biyoerişilebilirliklerindeki değişiklikler Tablo 4'te verilmiştir. Gastrik pH 1.5 iken, folik asidin biyoerişilebilirliğinin tüm numunelerde önemli ölçüde azaldığı ve % 42-67 arasında değiştiği bulunmuştur. Ayrıca, gastrik pH 4 iken folik asidin biyoerişilebilirliğinin tüm örneklerde tekrar önemli ölçüde azaldığı ve % 38-57 arasında değiştiği görülmüştür. Bebek mamalarında ve tahıl bazlı bebek ek gıdalarında en yüksek düşüş mide pH 4'te gözlemlenirken, süt ürünlerinde her iki pH seviyeleri arasındaki düşüşlerde anlamlı bir fark bulunmamıştır.



Şekil 8. Devam sütlerindeki folik asidin biyoerişilebilirliği

(Biyoerişilebilirlik, sindirimden sonraki değerlerin sindirimden önce elde edilen değerlere oranı ile belirlendi.)

Yukarıdaki sonuçlarda görüldüğü gibi, tüm bebek mamalarında folik asidin biyoerişilebilirliğinde bir azalma olmuştur. Spesifik olarak, bebek formülleri ve tahıl bazlı bebek ek gıdalarının biyoerişilebilirliklerinde en yüksek düşüşler mide pH 4'te gözlenmiştir. Buna ek olarak, devam sütlerinde gastrik pH 1.5 ve 4'te biyoyararlılık düşmesine rağmen, bu pH değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Bu çalışmada, in vitro gastrointestinal sistemde folik asidin bebek mamalarında, tahıl bazlı bebek ek gıdalarında ve devam sütlerindeki biyoerişilebilirlikleri incelenmiştir. Bebek mamalarında mide pH'ı 1,5'de biyoerişilebilirlik ortalama % 62 bulunmuştur. Mide pH'sı 4'te ise % 41'e düşmüştür. Tahıl bazlı bebek ek gıdalarında, biyoerişilebilirlik mide pH'ı 1.5'ta ortalama % 68 bulunurken, mide pH'ı 4'te % 41'e düşmüştür. Devam sütlerinde, biyoerişilebilirlik, mide pH'ı 1,5'de ortalama % 54 olarak belirlenirken, mide pH'ı 4'te % 47'ye düşmüştür ve bu iki düşüş arasında anlamlı bir azalma bulunamamıştır. Genel olarak, tüm numuneler değerlendirildiğinde, biyoerişilebilirlik mide pH'ı 1,5'de ortalama % 63 iken, mide pH'ı 4'de % 47'ye düşmüştür.



DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

TARTIŞMA

4.1. Metod Optimizasyonu

Folat ve folik asit analizleri için tri-enzim ekstraksiyonu önerilmiştir (Rychlika, vd., 2007; DerVies, vd., 2010). Folat poliglutamat zincirlerinin dekonjüjasyonu için amilaz ve proteaz ekstraksiyonundan sonra sıçan plazması ve tavuk pankreatini ile bir inkübasyon önerilmiştir. Bu çalışmada doğal folatlar analiz edilmediğinden, folik asit analizinde sadece di-enzim (proteazlı alfa-amilaz) ekstraksiyonu uygulanmıştır. Bu ekstraksiyon metodu ile referans materyaldeki folik asit miktarı $231 \pm 3.8 \mu\text{g} / 100\text{g}$ olarak belirlenmiştir. Sertifikalı referans materyaldeki folik asit miktarı $230 \pm 5.5 \mu\text{g} / 100 \text{g}$ olarak bulunmuştur ve geri kazanım ise % 101' dir. Pankreatin enzimi ile yapılan metot çalışması, di-enzim ekstraksiyonuna alternatif olarak kullanılmıştır. Pankreatin enzimi; amilolitik, lipolitik ve proteolitik enzimler içerdiğinden dolayı polisakaritleri, lipidleri ve proteinleri hidrolize edebilmektedir. Pankreatin; polisakaritleri dekstrinlere veya daha küçük glikoz moleküllerine, lipidleri gliserole ve yağ asitlerine ve proteinleri daha küçük peptitlere indirgeyebilmektedir (referans var dı yok).

Tablo 1'de gösterildiği gibi, farklı miktarlarda pankreatin kullanılarak sertifikalı referans materyaldeki folik asit içeriği (bebek formülü) pH 7'de 37 °C'de 2 saat inkübe edilerek tayin edildi. Sonuç olarak ekstraksiyonda en az 1 g pankreatin kullanıldığında folik asit miktarının $229 \pm 4.5 \mu\text{g} / 100 \text{g}$ olarak belirlendi. Sonuç olarak metodun geri kazanımı % 99 olduğu tespit edildi. Araştırmanın kalitesi ve metodun güvenilirliği için FAPAS testine sonuçlarımız kabul edilebilir aralıkta bulunmuştur ($-2 \leq Z \text{ skoru} \leq +2$).

Çalışma sırasında folik asit analizi için, di-enzim ekstraksiyonu yerine, ikinci metot olan pankreatin metodu ile ekstraksiyon yapıldı.

4.2. Bebek Ek Gıdalarındaki Folik Asit İçeriği

Bebek formüllerindeki folik asit miktarının yapılan bir çalışmada 10-43 $\mu\text{g} / 100 \text{ g}$ arasında olduğu tespit edilmiştir (Gimenez vd., 2018). Bizim araştırmamızdaki değerlerin yapılan çalışmadaki bebek mamalarının folik asit miktarından daha büyük olduğu görülmüştür (83-130 $\mu\text{g} / 100 \text{ g}$). USDA'da belirtilen bebek formüllerindeki folik asit miktarları 82 $\mu\text{g} / 100 \text{ g}$ ile 128 $\mu\text{g} / 100 \text{ g}$ değerleri arasında olup, bu değerler çalışmada bulunan sonuçlar ile çok yakındır (83-130 $\mu\text{g} / 100 \text{ g}$). Brandon ve ark. (2014) yaptıkları diğer bir çalışmada, bebek formüllerindeki etiket üzerinde belirtilen folik asit miktarı ile analiz sonucu elde edilen değerler arasında %43 ile %275 arasında bir sapma olduğu görülmüştür. Bizim çalışmamızda ise folik asidin ürün etiketlerinde bildirilen miktardan % 50 ile % 100 arasında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Tahıl bazlı bebek mamalarında folik asit miktarı USDA'ya göre 132 $\mu\text{g} / 100 \text{ g}$ ile 212 $\mu\text{g} / 100 \text{ g}$ arasında değişirken, bizim sonuçlarımız 61 $\mu\text{g} / 100 \text{ g}$ ile 138 $\mu\text{g} / 100 \text{ g}$ arasında değişmiştir. Türkiye'de kullanılan tahıl bazlı bebek ek gıdalarının folik asit miktarının daha düşük olduğu görülmesine rağmen, bu miktarlar Türk Gıda Kodeksinin bildirdiği sınırların aralığında olduğu belirtilmiştir.

Süt ve süt ürünleri doğal folat formu olan 5-MTHF içerir. Yapılan bir çalışmada bebek formüllerinin 0,9 $\mu\text{g} / 100 \text{ g}$ ile 2 $\mu\text{g} / 100 \text{ g}$ arasında 5-MTHF içerdiğini bulunmuştur (Gimenez vd., 2018). USDA ve DTU'nun süt ve süt ürünlerinde bulunan 5-MTHF miktarı 15 $\mu\text{g} / 100 \text{ g}$ ile 60 $\mu\text{g} / 100 \text{ g}$ arasında değişmektedir. Ayrıca inek sütü 5 $\mu\text{g} / 100 \text{ g}$ ile 7 $\mu\text{g} / 100 \text{ g}$ arasında 5-MTHF içerir. Süt ve süt ürünleri düşük miktarda 5-MTHF içermektedir.

4.3. In Vitro Biyoerişilebilirlik Analizleri

UHT ve pastörize süte folik asit ilave edildiğinde, biyoerişilebilirliğin % 58-61 arasında değiştiği, fakat bunun yerine doğal 5-CH₃-H₄-folat formu eklendiğinde biyoerişilebilirliğin % 71 olduğu bulunmuştur. (Verwei vd., 2003), Aynı çalışmada, FBP ilavesinden sonra folik asidin biyoerişilebilirliği % 44-51 arasına düşmüştür. Verwei ark. (2003) çalışmasına göre folik asidin biyoerişilebilirliği FBP etkisiyle

azalmıştır. Yapılan bu çalışmanın sonuçları ile bizim çalışmamızın sonuçları arasında benzerlik olması ve folik asidin biyoerişilebilirliğinde bir azalma olduğu görülmüştür.

FBP miktarı süt tozunda (inek) 2280-4450 mg / kg arasında değiştiğini (Swiatlo vd., 1990) ve pastörize inek sütünde ise 168 ± 20 mg / kg (Wigetrz, 1996). FBP'nin folatlara 1: 1 oranında bağlanabileceğini belirtmişlerdir (Paulos, C. M., vd., 2004). Bu çalışma kapsamındaki bebek mamaları ve tahıl bazlı bebek ek gıdalarında % 10-15 süt tozu içermektedir. Ayrıca, sentetik folik asidin bağlanma kapasitesinin doğal folat 5-CH₃-THF'den 100 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Nygren-Babol vd., 2005). Bu nedenle, bu bilgilere dayanarak, folik asidin FBP'lere bağlanması beklenmektedir. Klinik bir çalışmada, pastörize süte ve UHT süte folik asit eklenmesinin, serum folat seviyesini arttırdığı belirtilmiş; FBP ilavesinin ise folat seviyesini etkilemediği görülmüştür (Jong vd., 2005). İspanaktaki folatın biyoerişilebilirliği % 78-80 arasında değiştiği bildirilmiştir (Verwei, 2004). Bununla birlikte süt ürünlerinde folik asidin biyoerişilebilirliğinin süt içermeyen ürünlerden daha düşük olduğu gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada folik asidin biyoerişilebilirliğinin düşük olduğu bulunmuştur. Bunun nedenlerinden biri ürünlerdeki FBP'nin folik aside güçlü şekilde bağlı olmasıdır. Gastrik pasajdan önce folat ve folik asit benzer oranlarda (% 76-79) FBP'ye bağlanmış, ancak geçiş sırasında folik asit % 80-81 oranında FBP'ye bağlı kalırken, 5-CH₃-THF'in bağlanma oranı % 79'dan % 5'e düşmüştür. (Verwei vd., 2000). Bu çalışma, folik asidin ve 5-CH₃-THF'nin, mide geçişinden sonra hala FBP'ye bağlanabileceğini ve FBP'nin, her iki folat bileşiğinin ince bağırsaktan emilim oranını etkilediğini göstermektedir. 0-6 aylık bebeklerin mide asiditesi yetişkinlerdekinden çok farklıdır (Bourlieu vd. 2014). Bu nedenle, in vitro çalışmaların bu durumu dikkate alması gerektiği vurgulanmaktadır. Bebeklerin mide pH'larının beslenmeden önce 3-4 arasında değiştiği, ancak emzirmeden sonra 6.0-6.5'e çıktığı bildirilmiştir. Yetişkinlerin gastrik pH'larının 1.5-1.8 arasında değiştiği bildirilmiştir (Nagita vd., 1996). İki saat beslendikten sonra bebek sütü pH'ının 4-5 arasında olduğu, yetişkinlerde ise 2'nin altında olduğu vurgulanmıştır (Li-Chan ve Nakai, 1989). Gastrik pH < 5.5 olduğunda FBP folik asitten ayrılmaya başlamaktadır (Picciano, M. F., vd., 2004). Bu nedenle, yapılan çalışmada, gastrik pH değeri 1.5 olan hastalarda, FBP'den daha fazla folik asit ayrıldığı ve daha fazla serbest folik asidin ince bağırsaklara geçtiği düşünülmektedir.

Pepsin, proteinlerin midede hidrolizinden sorumlu olan bir proteazdır. Bebeklerin gastrik pH'ları yetişkinlerde olduğundan daha yüksek olduğundan, pepsin enzimi daha az salgılanır ve sütte proteinlerin hidrolizinin bebeklerde erişkinlerden daha az olması beklenir (Dipalma ve ark. 1991). Ek olarak, FBP bir peynir altı suyu proteini olduğundan, hidrolize dirençlidir ve bebeklerde tamamen hidrolize edilemez. Bu nedenle, yapılan çalışmanın sonuçları FBP'nin mide enzimleri veya pH 4'teki asitlikten etkilendiğini göstermektedir. Dolayısıyla FBP ince bağırsaktan geçerken daha kararludur.

Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, asidik koşullar altında (pH <4.5), folik asit midede FBP'den ayrılarak, ince bağırsakta tekrar bağlanmaktadır (pH 6-7) (Picciano, M. F., vd., 2004). Bu çalışmaya göre, midedeki FBP, pepsinden etkilenmemekte ve ince bağırsakta yeniden aktive edilmektedir. Genel olarak, yapılan çalışmanın sonuçları incelendiğinde folik asidin biyoerişilebilirliğinin 1,5 gastrik pH'da ortalama % 63, mide pH 4'te % 47 olduğunu göstermektedir. Görüldüğü gibi folik asidin biyoerişilebilirliği gastrik pH 4'te daha düşüktü. Bu veriler, mide pH'sının folik asit biyoerişilebilirliğini etkilediğini işaret etmektedir.

Yoğurt fermente bir ürün olduğundan, FBP miktarı çok düşüktür. Folik asit ve folatın yoğurt içerisine eklenmesi durumunda biyoerişilebilirliğin her ikisi için de aynı seviyede olduğu belirtilmektedir (% 82). Bununla birlikte, FBP'nin yoğurt içerisine eklenmesiyle folik asidin biyoerişilebilirliği % 34'e düşerken, folatın biyoerişilebilirliği % 57'ye düşmüştür. Yoğurtla yapılan bu çalışma, FBP'nin folik asit biyoerişilebilirliği üzerinde bir etkisi olduğunu desteklemektedir (Arkbåge vd., 2003). Yapılan bu çalışma bağlamında ürünlerle ilgili literatür incelendiğinde, özellikle bebek mamasında ve tahıl bazlı bebek ek gıdalarında yüksek oranda FBP olduğu gözlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen devam sütleri, ultra yüksek sıcaklıkta işlem görmüş süt olan UHT süt kullanılarak formüle edilmiştir. Çiğ süt ile karşılaştırıldığında, pastörize sütte FBP; % 8, UHT sütte % 19 azalmıştır. Ayrıca ısıl işleme rağmen FBP'nin bozulmadığı belirtildi (Wigertz vd., 1996). Yapılan çalışmada, devam sütlerinde folik asit miktarının diğer ürünlere göre düşük olarak saptanmıştır. Bununla birlikte, sütte bulunan az miktardaki FBP'nin bile folik asidin biyoerişilebilirliğini etkilediğini göstermektedir.

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

Takviyeli veya takviye edilmemiş gıda ürünlerinde folat veya folik asidin biyoyararlanımı hakkında bilgi, bu ürünlerdeki günlük folat miktarının günlük gıda gereksinimlerini karşılayıp karşılamadığını belirlemek için gereklidir. Bebeklerle ilgili klinik çalışmaların sınırlı sayıda olmasından dolayı, in vitro çalışmalar bize günlük yiyeceklerimizi tüketerek tamamlayıcı folik asit veya başka besinleri ne ölçüde alabileceğimizi gösterebilir. Bu çalışma kapsamında gözlemlendiği gibi bebek besinlerine takviye edilmiş folik asidin biyoyararlılığının hem FBP hem de gastrik pH'ından etkilendiği düşünülmektedir. Bu nedenle, folik asidin in vitro biyoerişilebilirliğinin yüksek gastrik pH'da daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar folik asidin biyoerişilebilirliğinin in vivo olarak daha düşük olabileceğini göstermektedir. Muhtemelen, in vivo ve in vitro çalışmalar göz önünde bulundurularak, yeni formülasyonlar planlanırken günlük besin gereksinimleri gözden geçirilebilir.

Bu çalışmada görüldüğü gibi, bir bebek maması mide pH'ı 1.5 iken, folik asidin biyoerişilebilirliğinin tüm numunelerde % 56-71 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Ayrıca, mide pH'ı 4 iken, folik asidin biyoerişilebilirliği tüm örneklerde azalarak % 35-49 arasında değişmiştir.

Tahıl bazlı bebek ek gıdalarındaki ilave folik asidin in vitro biyoerişilebilirlikleri mide pH değeri 1.5 iken, % 60-78 arasında değişmektedir. Mide pH'ının 4 olması durumunda folik asidin biyoerişilebilirliğinin tüm örneklerde önemli ölçüde azalarak % 31-67 arasında değiştiği bulunmuştur.

Devam sütlerinde takviye edilmiş folik asidin in vitro biyoerişilebilirlikleri gastrik pH 1.5 iken, folik asidin biyoerişilebilirliğinin tüm numunelerde % 42-67 arasında değiştiği bulunmuştur. Ayrıca, gastrik pH 4 iken folik asidin biyoerişilebilirliğinin tüm örneklerde önemli ölçüde azaldığı ve % 38-57 arasında değiştiği bulunmuştur.

Bebek mamalarında ve tahıl bazlı bebek ek gıdalarında en yüksek düşüş mide pH 4'te gözlemlenirken, süt ürünlerinde pH seviyelerinin hiçbirinde bu düşüşlerde anlamlı bir fark bulunamamıştır.



KAYNAKLAR

- Achanta, K., Boeneke, C. A., & Aryana, K. J. (2007). Characteristics of reduced fat milks as influenced by the incorporation of folic acid. *Journal of dairy science*, 90(1), 90-98.
- Anonim. (1992). Interspecies differences in folate metabolism. *Nutr Rev.* 50:116-8.
- Anonim. (2006). 5-Methyltetrahydrofolate. *Alternative Medicine Review*. Volume 11, Number 4. 330-337.
- Antony, A. C., & Hansen, D. K. (2000). Hypothesis: folate-responsive neural tube defects and neurocristopathies. *Teratology*, 62(1), 42-50.
- Arcot, J., & Shrestha, A. (2005). Folate: methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 16(6-7), 253-266.
- Arkbage, K., Verwei, M., Havenaar, R., & Withhöft, C. (2003). Bioaccessibility of folic acid and (6 S)-5-methyltetrahydrofolate decreases after the addition of folate-binding protein to yogurt as studied in a dynamic in vitro gastrointestinal model. *The Journal of nutrition*, 133(11), 3678-3683.
- Bailey, L. B., Rampersaud, G. C., & Kauwell, G. P. (2003). Folic acid supplements and fortification affect the risk for neural tube defects, vascular disease and cancer: evolving science. *The Journal of Nutrition*, 133(6), 1961S-1968S.
- Ball, G. F. (2005). *Vitamins in foods: analysis, bioavailability, and stability*. CRC Press.
- Ball, G. F. (2013). *Bioavailability and analysis of vitamins in foods*. Springer.
- Ball, G.F.M., (2004) *Vitamins: Their Role in the Human Body*, Blackwell Publishing Ltd, sayfa 348-349
- Barbé, F., Ménard, O., Le Gouar, Y., Buffière, C., Famelart, M. H., Laroche, B., ... ve Rémond, D. (2013). The heat treatment and the gelation are strong determinants of the kinetics of milk proteins digestion and of the peripheral availability of amino acids. *Food Chemistry*, 136(3-4), 1203-1212.
- Bassett, M. N., & Sammán, N. C. (2010). Folate content and retention in selected raw and processed foods. *Arch Latinoam Nutr*, 60(3), 298-305.
- Bender, D. A. (2003). *Nutritional biochemistry of the vitamins*. Cambridge university press.
- Benito, P., & Miller, D. (1998). Iron absorption and bioavailability: an updated review. *Nutrition Research*, 18(3), 581-603.

- Berry, R. J., Li, Z., Erickson, J. D., Li, S., Moore, C. A., Wang, H., ... & Hong, S. X. (1999). Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. *New England journal of medicine*, 341(20), 1485-1490.
- Birn, H. (2006). The kidney in vitamin B12 and folate homeostasis: characterization of receptors for tubular uptake of vitamins and carrier proteins. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 291(1), F22-F36.
- Birn, H., Zhai, X., Holm, J., Hansen, S. I., Jacobsen, C., Christensen, E. I., & Moestrup, S. K. (2005). Megalin binds and mediates cellular internalization of folate binding protein. *The FEBS journal*, 272(17), 4423-4430.
- Blenford, D. (1995). Bioavailability is key to nutrient effectiveness. *Food Ingredients and Processing International*, 17, 28-30.
- Boeneke, C. A., & Aryana, K. J. (2008). Effect of folic acid fortification on the characteristics of lemon yogurt. *LWT-Food Science and Technology*, 41(7), 1335-1343.
- Botto, L. D., & Yang, Q. (2000). 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *American journal of epidemiology*, 151(9), 862-877.
- Bouayed, J., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food chemistry*, 128(1), 14-21.
- Boushey, C. J., Beresford, A. A., Omen, G. S. & Motulsky, A. G (1996) A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *J. Am. Med. Assoc.* 274: 1049–1057.
- Brandon, M. I., Bakker, E., Kramer, H., Bouwmeester, T., Zuidema M., (2014) Bioaccessibility of vitamin A, vitamin C and folic acid from dietary supplements, fortified food and infant formula, *E. F. A.* 65, 426-435
- Breithaupt, D. E. (2001). Determination of folic acid by ion-pair RP-HPLC in vitamin-fortified fruit juices after solid-phase extraction. *Food chemistry*, 74(4), 521-525.
- Brouwer, I. A., van Dusseldorp, M., West, C. E., Meyboom, S., Thomas, C. M., Duran, M., ... & Steegers-Theunissen, R. P. (1999). Dietary folate from vegetables and citrus fruit decreases plasma homocysteine concentrations in humans in a dietary controlled trial. *The Journal of nutrition*, 129(6), 1135-1139.
- Chew, S. C., Loh, S. P., & Khor, G. L. (2012). Determination of folate content in commonly consumed Malaysian foods. *International Food Research Journal*, 19(1), 189.

- Clifford, A. J., Heid, M. K., Peerson, J. M., & Bills, N. D. (1991). Bioavailability of food folates and evaluation of food matrix effects with a rat bioassay. *The Journal of nutrition*, 121(4), 445-453.
- Clifford, A. J., Jones, A. D., & Bills, N. D. (1990). Bioavailability of folates in selected foods incorporated into amino acid-based diets fed to rats. *The Journal of nutrition*, 120(12), 1640-1647.
- Cuskelly, G. J., McNulty, H. & Scott, J. M. (1996) Effect of increasing dietary folate on red-cell folate: implications for prevention of neural tube defects. *Lancet* 347: 657–659.
- de Jong, R. J., Verwei, M., West, C. E., van Vliet, T., Siebelink, E., van den Berg, H., & Castenmiller, J. J. (2005). Bioavailability of folic acid from fortified pasteurised and UHT-treated milk in humans. *European journal of clinical nutrition*, 59(8), 906.
- DiPalma, J., Kirk, C. L., Hamosh, M., Colon, A. R., Benjamin, S. B., & Hamosh, P. (1991). Lipase and pepsin activity in the gastric mucosa of infants, children, and adults. *Gastroenterology*, 101(1), 116-121.
- Donovan, S. M. (2006). Role of human milk components in gastrointestinal development: current knowledge and future needs. *The Journal of pediatrics*, 149(5), S49-S61.
- Dupont, D., Mandalari, G., Mollé, D., Jardin, J., Rolet-Répécaud, O., Duboz, G., ... & Mackie, A. R. (2010). Food processing increases casein resistance to simulated infant digestion. *Molecular nutrition & food research*, 54(11), 1677-1689.
- Eichholzer, M., Tönz, O., & Zimmermann, R. (2006). Folic acid: a public-health challenge. *The Lancet*, 367(9519), 1352-1361.
- Engbersen, A. M., Franken, D. G., Boers, G. H., Stevens, E. M., Trijbels, F. J., & Blom, H. J. (1995). Thermolabile 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. *American journal of human genetics*, 56(1), 142.
- Eskes, T. K. (2000). From anemia to spina bifida—the story of folic acid: A tribute to Professor Richard Smithells. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 90(2), 119-123.
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., & Pérez-Gálvez, A. (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition research*, 29(11), 751-760.
- Food and Drug Administration. (1993). Food labeling: health claims and label statements; folate and neural tube defects. *Fed Regist*, 58, 53254-95.

- Ford, E. S., Byers, T. E., & Giles, W. H. (1998). Serum folate and chronic disease risk: findings from a cohort of United States adults. *International journal of epidemiology*, 27(4), 592-598.
- Garbis, S. D., Melse-Boonstra, A., West, C. E., & van Breemen, R. B. (2001). Determination of folates in human plasma using hydrophilic interaction chromatography– tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 73(22), 5358-5364.
- Gharibzahedi, S. M. T., & Jafari, S. M. (2017). The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation. *Trends in Food Science & Technology*, 62, 119-132.
- Giménez C.E., Bénét S., Oguey Y., Martin F.,Redeuil K., (2018). The contribution of minor folates to the total vitamin B9 content of Infant formula and clinical nutrition products. *Food Chemistry*, 2018, 249, 91-97
- Giovanucci, E., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Hunter, D. J., Fuchs, C., Rosner, B. A., Speizer, F. E. & Willet, W. C. (1998) Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the Nurses' Health Study. *Ann. Intern. Med.* 129: 517–524.
- Graham, I. A. & O'Allaghan, P. (2000) The role of folic acid in the prevention of cardiovascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 11: 577–587
- Haslam, N., & Probert, C. S. (1998). An audit of the investigation and treatment of folic acid deficiency. *Journal of the Royal Society of medicine*, 91(2), 72-73.
- Hernell, O. (2011). Human milk vs. cow's milk and the evolution of infant formulas. In *Milk and milk products in human nutrition* (Vol. 67, pp. 17-28). Karger Publishers.
- Honein, M. A., Paulozzi, L. J., Mathews, T. J., Erickson, J. D., & Wong, L. Y. C. (2001). Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. *Jama*, 285(23), 2981-2986
- Houghton, L. A., Green, T. J., Donovan, U. M., Gibson, R. S., Stephen, A. M., & O'Connor, D. L. (1997). Association between dietary fiber intake and the folate status of a group of female adolescents. *The American journal of clinical nutrition*, 66(6), 1414-1421.
- Indrawati, Arroqui, C., Messagie, I., Nguyen, M. T., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2004). Comparative study on pressure and temperature stability of 5-methyltetrahydrofolic acid in model systems and in food products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(3), 485-492
- Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. (1998). *Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline*. National Academies Press (US).

- Jones, M. L., Treloar, T., & Nixon, P. F. (2003). Dietary interactions influence the effects of bovine folate-binding protein on the bioavailability of tetrahydrofolates in rats. *The Journal of nutrition*, 133(2), 489-495.
- Kane, M. A., & Waxman, S. (1990). Role of folate binding proteins in folate metabolism. In *Pathology Reviews*• 1990 (pp. 39-48). Humana Press, Totowa, NJ.
- Keagy, P. M. (1990). Animal assays for folate bioavailability: a critical evaluation. *Picciano, MF, et al*, 139-150.
- Konings, E. J., Roomans, H. H., Dorant, E., Goldbohm, R. A., Saris, W. H., & van den Brandt, P. A. (2001). Folate intake of the Dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods. *The American journal of clinical nutrition*, 73(4), 765-776.
- Krishnaswamy, K., & Nair, K. M. (2001). Importance of folate in human nutrition. *British Journal of Nutrition*, 85(S2), S115-S124.
- Krumdieck, C. L. (1990). Folic acid. In M. E. Brown (Ed.), *Present knowledge in nutrition* (pp. 179–188), Washington, DC: ILSI.
- Landen Jr, W. O., Eitenmiller, R. R., & Ye, L. (2016). *Vitamin analysis for the health and food sciences*. CRC press.
- LeBlanc, J. G., de Giori, G. S., Smid, E. J., Hugenholtz, J., & Sesma, F. (2007). Folate production by lactic acid bacteria and other food-grade microorganisms. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*, 1, 329-339.
- Lin, M. Y., & Young, C. M. (2000). Folate levels in cultures of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 10(5-6), 409-413.
- Lönnerdal, B. (2003). Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *The American journal of clinical nutrition*, 77(6), 1537S-1543S.
- Lönnerdal, B. (2013). Bioactive proteins in breast milk. *Journal of paediatrics and child health*, 49, 1-7.
- Lucock, M. (2000). Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Molecular genetics and metabolism*, 71(1-2), 121-138.
- Ménard, O., Cattenoz, T., Guillemin, H., Souchon, I., Deglaire, A., Dupont, D., ve Picque, D. (2014). Validation of a new in vitro dynamic system to simulate infant digestion. *Food Chemistry*, 145, 1039-1045.
- Mulinare, J., Erickson, J. D., James, L. M., & Berry, R. J. (1995, June). DOES PERICONCEPTIONAL USE OF MULTIVITAMINS REDUCE THE OCCURRENCE OF BIRTH-DEFECTS. In *American Journal of Epidemiology* (Vol. 141, No. 11, pp. S3-S3). 624 N BROADWAY RM 225, BALTIMORE, MD 21205: AMER J EPIDEMIOLOGY.

- Nygren, L., Sternesjö, Å., & Björck, L. (2003). Determination of folate-binding proteins from milk by optical biosensor analysis. *International Dairy Journal*, 13(4), 283-290.
- Nygren-Babol, L., & Jägerstad, M. (2012). Folate-binding protein in milk: a review of biochemistry, physiology, and analytical methods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 52(5), 410-425.
- Nygren-Babol, L., & Karonen, K. L. (2009). The effect of different folate forms on denaturation of bovine folate binding protein. *International dairy journal*, 19(8), 437-442.
- Nygren-Babol, L., Sternesjö, Å., Jägerstad, M., & Björck, L. (2005). Affinity and rate constants for interactions of bovine folate-binding protein and folate derivatives determined by optical biosensor technology. Effect of stereoselectivity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(13), 5473-5478.
- Office of Dietary Supplements (ODS), 2009, Dietary Supplement Fact Sheet; National Institutes of Health (NIH): Bethesda, MD.
- Parada, J., & Aguilera, J. M. (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of food science*, 72(2), R21-R32.
- Parodi, P. W. (1997). Cow's milk folate binding protein: Its role in folate nutrition. *Australian journal of dairy technology*, 52(2), 109.
- Paulos, C. M., Turk, M. J., Breur, G. J., & Low, P. S. (2004). Folate receptor-mediated targeting of therapeutic and imaging agents to activated macrophages in rheumatoid arthritis. *Advanced drug delivery reviews*, 56(8), 1205-1217.
- Picciano, M. F., West, S. G., Ruch, A. L., Kris-Etherton, P. M., Zhao, G., Johnston, K. E., ... & Tamura, T. (2004). Effect of cow milk on food folate bioavailability in young women. *The American journal of clinical nutrition*, 80(6), 1565-1569.
- Pope, J. F., Skinner, J. D., & Carruth, B. R. (1997). Adolescents' self-reported motivations for dietary changes during pregnancy. *Journal of Nutrition Education*, 29(3), 137-144.
- Rampersaud, G. C., Bailey, L. B., & Kauwell, G. P. (2002). Relationship of folate to colorectal and cervical cancer: review and recommendations for practitioners. *Journal of the American Dietetic Association*, 102(9), 1273-1282.
- Rébeillé, F., Ravanel, S., Jabrin, S., Douce, R., Storozhenko, S., & Van Der Straeten, D. (2006). Folates in plants: biosynthesis, distribution, and enhancement. *Physiologia Plantarum*, 126(3), 330-342.
- Refsum, H. (2001). Folate, vitamin B12 and homocysteine in relation to birth defects and pregnancy outcome. *British Journal of Nutrition*, 85(S2), S109-S113.

- Relton, C. L., Pearce, M. S., & Parker, L. (2005). The influence of erythrocyte folate and serum vitamin B 12 status on birth weight. *British Journal of Nutrition*, 93(5), 593-599.
- Reynolds, E. H. (2002). Folic acid, ageing, depression, and dementia. *Bmj*, 324(7352), 1512-1515.
- Satchell, B. F. (1996). FDA technical report. FDA/61RF-8781.
- Scaglione, F., & Panzavolta, G. (2014). Folate, folic acid and 5-methyltetrahydrofolate are not the same thing. *Xenobiotica*, 44(5), 480-488.
- Scott, J., Rébeillé, F., & Fletcher, J. (2000). Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 795-824.
- Selhub, J. & Rosenberg, I. H. (1996) Folic acid. In: *Present Knowledge in Nutrition*, 7th ed. (Ziegler, E. E. & Filer, L. J., Jr., eds.), pp. 206–219. International Life Sciences Institute Press, Washington, DC
- Shohag, M. J. I., Wei, Y. Y., Yu, N., Zhang, J., Wang, K., Patring, J., ... & Yang, X. E. (2011). Natural variation of folate content and composition in spinach (*Spinacia oleracea*) germplasm. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(23), 12520-12526.
- Snow, C. F. (1999). Laboratory diagnosis of vitamin B12 and folate deficiency: a guide for the primary care physician. *Archives of internal medicine*, 159(12), 1289-1298.
- Sopade, P. A., & Gidley, M. J. (2009). A rapid in-vitro digestibility assay based on glucometry for investigating kinetics of starch digestion. *Starch-Stärke*, 61(5), 245-255.
- Sweeney, M. R., McPartlin, J., Weir, D. G., Daly, S., Pentieva, K., Daly, L., & Scott, J. M. (2005). Evidence of unmetabolised folic acid in cord blood of newborn and serum of 4-day-old infants. *British Journal of Nutrition*, 94(5), 727-730.
- Swiatlo, N., O'Connor, D. L., Andrews, J., & Picciano, M. F. (1990). Relative folate bioavailability from diets containing human, bovine and goat milk. *The Journal of nutrition*, 120(2), 172-177.
- Tamura, T. (1997) Bioavailability of folic acid in fortified foods. *Am. J. Clin. Nutr.* 66: 1299–1300
- United States Department of Agriculture (USDA), 2010, Agricultural Research Service (ARS). USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 23; USDAARS: Beltsville, MD.
- Uysal, U. D., Oncu-Kaya, E. M., & Tunçel, M. (2010). Determination of folic acid by CE in various cultivated variety of lentils. *Chromatographia*, 71(7-8), 653-658.

- VanderJagt, D. J., Spelman, K., Ambe, J., Datta, P., Blackwell, W., Crossey, M., & Glew, R. H. (2000). Folate and vitamin B12 status of adolescent girls in northern Nigeria. *Journal of the National Medical Association*, 92(7), 334.
- Verwei, M. (2004). Bioavailability of folate from fortified milk products.
- Verwei, M., Arkbåge, K., Havenaar, R., van den Berg, H., Witthöft, C., & Schaafsma, G. (2003). Folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in fortified milk are bioaccessible as determined in a dynamic in vitro gastrointestinal model. *The Journal of nutrition*, 133(7), 2377-2383.
- Verwei, M., Arkbåge, K., Mocking, H., Havenaar, R., Groten, J., (2004). The binding of folic acid and 5-methyltetrahydrofolate to folate-binding proteins during gastric passage differs in a dynamic in vitro gastrointestinal model. *The Journal of Nutrition* 134, 31–37
- Villanueva, J. A., & Halsted, C. H. (2004). Hepatic transmethylation reactions in micropigs with alcoholic liver disease. *Hepatology*, 39(5), 1303-1310.
- VLAG (Advanced Studies in Food Technology, Agrobiotechnology, Nutrition and Health Sciences): Bioavailability '97. Book of Abstracts, 25.-28. May 1 997. Wageningen. The Netherlands, 1997
- Wei, M. M., & Gregory, J. F. (1998). Organic acids in selected foods inhibit intestinal brush border pteroylpolyglutamate hydrolase in vitro: potential mechanism affecting the bioavailability of dietary polyglutamyl folate. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(1), 211-219.
- Wigertz, K. (1997). Milk folates. Characterisation and availability. Dissertation, Univ of Lund 1997
- Wigertz, K., Hansen, S. I., Høier-Madsen, M., Holm, J. & Jägerstad, M. (1996) Effect of milk processing on the concentration of folate binding protein (FBP), the folate binding capacity and the retention of 5-methyltetrahydrofolate. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 47: 315–322
- Witthöft, C. M., Forssén, K., Johannesson, L., & Jägerstad, M. (1999). Folates-food sources, analyses, retention and bioavailability. *Näringsforskning*, 43(1), 138-146.
- Zema, P., & Pilosof, A. M. (2018). On the binding of folic acid to food proteins performing as vitamin micro/nanocarriers. *Food hydrocolloids*, 79, 509-517.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Ömer Faruk MIZRAK
Doğum Tarihi : 20.04.1994
Doğum Yeri : Konya
Cep Telefonu : 0542 485 20 40
Mail : mizrakomerfaruk@gmail.com

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Beslenme ve Diyetetik	Bahçeşehir Üniversitesi	2013-2017
Yüksek Lisans	Beslenme ve Diyetetik (Tezli)	İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi	2017-2019

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. Mustafa Yaman, **Ömer Faruk Mızrak**, Jale Çatak, Hafsa Sena Sargın, (2019), In vitro bioaccessibility of added folic acid in commercially available baby foods formulated with milk and milk products, Food Science and Biotechnology, ISSN 1226-7708, Food Sci Biotechnol, DOI 10.1007/s10068-019-00625-5

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler:

1. Hafsa Sena Sargın, Dr. Öğretim Üyesi Mustafa Yaman, Dr. Öğretim Üyesi Jale Çatak, **Ömer Faruk Mızrak**, Kahvaltılık Gevreklerin Glisemik İndekslerinin İn Vitro Yöntemlerle Belirlenmesi, International Conference on Food, Nutrition and Dietetics, Gastronomy Research (FONGAR), 2018
2. Dr. Öğretim Üyesi Jale Çatak, Dr. Öğretim Üyesi Mustafa Yaman, **Ömer Faruk Mızrak**, Hafsa Sena Sargın, Ülkemizde Tüketilen Bebek Sütleri (Toz) ve Çocuk Devam Sütlerine (Sıvı) Takviye Edilen Folik Asidin Biyoerişilebilirliğinin İn Vitro Gastrointestinal Sistem ile İncelenerek Belirlenmesi, 5. Uluslararası Sağlık ve Spor Bilimleri Sempozyumu, 2018
3. Halime Uğur, **Ömer Faruk Mızrak**, Esra Yıldırım Servi, Dr. Öğretim Üyesi Mustafa Yaman, Determination of In Vitro Bioaccessibility of Added Vitamin C in Commercially Available Vegetable and Fruit Based Baby Complementary Foods, 7. İlk 1000 Gün Anne-Çocuk- Beslenme Kongresi, 2019
4. Hafsa Sena Sargın, Elif Ede, **Ömer Faruk Mızrak**, Mustafa Yaman, Determination Of Essential And Branched Chain Aminoacids In Grain Based Breakfast Cereals: An Evaluation Of In Terms Of Healthy Nutrition, II. International Health Science and Life Congress, 2019

5. Elif Ede, **Ömer Faruk Mızrak**, Mustafa Yaman, Determination Of Potentially Advanced Glyculation Products In Snack Products, II. International Health and Life Science Congress, 2019

C. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

1. Hafsa Sena Sargın, Dr. Öğretim Üyesi Mustafa Yaman, Dr. Öğretim Üyesi Jale Çatak, **Ömer Faruk Mızrak**, Mehmet Tevfik Nargül, Esra Özkan, Atıştırmalık Bisküvilerin Glisemik İndekslerinin İn Vitro Yöntemlerle Belirlenmesi, 9. Ulusal Obezite Kongresi, 2018
2. Mustafa Yaman, **Ömer Faruk Mızrak**, Hafsa Sena Sargın, Jale Çatak, Tahıl-Bazlı Bebek Ek Gıdalarına Takviye Edilen Folik Asidin İn Vitro Biyoerişilebilirliğinin Belirlenmesi, Sağlıklı Büyüyen Çocuk Kongresi, 2018

