T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROBİYOTİK KÜLTÜR İMMOBİLİZASYONU; STABİLİTE VE OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI

Dyt. Begüm SIDAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Halide AYDOĞDU

EDİRNE – 2019

BEGÜM SIDAL'ın hazırladığı "PROBİYOTİK KÜLTÜR İMMOBİLİZASYONU; STABİLİTE VE OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):

İmza

Prof. Dr. Zeynep ERDOĞAN

Dr. Öğr. Üyesi Özge ÖZCAN

Dr. Öğr. Üyesi Halide AYDOĞDU

Tez Savunma Tarihi: 05/07/2019

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Halide AYDOĞDU

Tez Danışmanı

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Murat YURTCAN

Fen Bilimleri Enstitü Müdürü

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

05 / 07 / 2019

Begüm SIDAL

Yüksek Lisans Tezi

Probiyotik Kültür İmmobilizasyonu; Stabilite ve Optimizasyon Çalışmaları
T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Bu tez çalışmasında probiyotik bir bakteri olan *Lactobacillus rhamnosus*'un immobilize edilmesi, immobilizasyon şartlarının optimizasyonu, farklı koşullarda bakterilerin hayatta kalabilme yeteneklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Probiyotik bakterilerin immobilize edilmelerindeki en önemli nedenler; eklendiği gıdadaki canlı kaldığı süreyi uzatmak ve bağırsağa maksimum sayıda mikroorganizma geçebilmesini sağlayabilmektir.

Lactobacillus rhamnosus'un immobilize edildiği bu çalışmada sodyum alginat, karragenan ve pektin farklı destek materyalleri olarak denenmiştir. İmmobilizasyonun optimize edilmesi çalışmalarında ise alginat ve $CaCl_2$ yüzdesinin, yüklenen mikroorganizma sayısının etkileri araştırılmıştır. İmmobilizasyonda elde edilen boncuklarda tutulan canlı probiyotik mikroorganizma sayısını belirlemek üzere yapılacak çalışmalar için boncuk patlatma yöntemlerinin (vortex, stomacher, homojenizatör, çalkalamalı inkübatör) etkisi de araştırılmıştır. Ayrıca immobilize bakterinin çeşitli pH değerlerine duyarlılığı, mide asidi ve safraya direnci; serbest haldeki bakteriler kontrol olarak kullanılarak saptanmıştır.

Yapılan deneyler sonucunda, en uygun destek materyalinin immobilizasyon etkinliği %89.76 olan sodyum alginat olduğu belirlernmiştir. Optimum parametreler bakteri sayısı 7.46 log CFU/g ile %2'lik alginat, bakteri sayısı 7.47 log CFU/g ile %3'lük $CaCl_2$ ve %25'lik bakteri yüzdesi şeçilmiştir. Mikroorganizmaların boncuklardan çıkarılmasında en etkili yöntemin 7.46 log CFU/g koloni sayısı ile ultrasonik homojenizatör ile patlatma olduğu belirlenmiştir. Serbest haldeki bakterilerin mide asidi ve safra ile muamele edildikten sonra hiç üreyemedikleri, immobilize

bakterilerin yapay mide suyunda %68.39, safra tuzunda %58.82 oranında hayatta kaldıkları gözlenmiştir.

Sonuç olarak yapılan bu çalışma ile *L.rhamnosus*'un alginata immobilizasyonu yüksek etkinlik ile gerçekleştirilmiş, immobilizasyon koşulları optimize edilmiş ve immobilizasyonun bakterilerin hayatta kalabilirliği üzerine etkili olduğu saptanmıştır.

Yıl: 2019

Sayfa Sayısı: 68

Anahtar Kelimeler: *Lactobacillus rhamnonus*, probiyotik, immobilizasyon, optimizasyon, beslenme.

Master Thesis

Probiotic Culture İmmobilization; Studies on Stability and Optimization

Trakya University Institute of Science
Biotechnology and Genetics of Department

ABSTRACT

In this study, it is aimed to immobilize probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus*, to optimize immobilization conditions, to investigate the survival ability of bacteria under different conditions. The most important reasons for the immobilization of probiotic bacteria are extending the period of the food in which it is added and allowing the maximum number of microorganisms passing through the intestine.

In this study in which *Lactobacillus rhamnosus* was immobilized, sodium alginate, carrageenan and pectin were tested as different supportive materials. In the optimization studies for immobilization, the impacts of percentage of alginate and $CaCl_2$ and the number of microorganisms loaded were investigated. The effect of bead blasting methods (vortex, stomacher, homogenizer, shaking incubator) on the studies which determine the number of viable probiotic microorganisms retained in beads obtained from immobilization was investigated. In addition, susceptibility of immobilized bacteria to various pH values, resistance to gastric acid and bile were detected by using free bacteria as a control.

As a result of the experiments, it was determined that the most suitable supportive material was sodium alginate which had an immobilization efficiency of 89.76%. The optimum parameters were found to be 2% alginate with 7.46 log CFU / g, 3% $CaCl_2$ and 25% bacteria with 7.47 log CFU / g. The most effective method for removing microorganisms from beads was detonation with an ultrasonic homogenizer with a colony number of 7.46 log CFU / g. It was observed that free bacteria could not

survived after treatment with gastric acid and bile, whereas immobilized bacteria survived 68.39% in artificial gastric juice and 58.82% in bile salt.

As a result of this study, immobilization of *L. rhamnosus* by alginate was performed with high efficiency, the conditions of the immobilization were optimized and the immobilization was found to be effective on the viability of the bacteria.

Year: 2019
Number of Pages: 68
Keywords: *Lactobacillus rhamnonus*, probiotic, immobilization, optimization, nutrition.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa başladığım günden tezimi bitirene kadar desteğini esirgemeyen, bana yol gösteren, tezimin her aşamasında yanımda olan, beni her zaman sabırla ve anlayışla karşılayan, gece gündüz demeden vaktini bana ayıran, benim için yeri her zaman ayrı olan ve her zaman da ayrı olacak değerli tez danışmanım sayın Dr. Öğr. Üyesi Halide AYDOĞDU'ya,

Gerek bilgisiyle, gerek ilgisiyle, gerekse abla sıcaklığıyla beni kucaklayan, yardımını eksik etmeyen, sayın Arş. Gör. Dr. Gamze Altıntaş KAZAR'a

Tez çalışmalarımda göstermiş olduğu ilgi ve yardımlarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Özge ÖZCAN'a

Chr. Hansen firmasından kültür temininde yardımcı olan Chr. Hansen Gıda San. ve Tic. A.Ş.'den Sayın Sercan PEKEL ve Betül Nur SİNİRLİOĞLU'na

Bağlı bulunduğum Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanlığı'na,

Beni bu günlere getiren, her zaman düşüncelerime, hedeflerime saygı gösteren ve destek veren, hayatımın her anında yanımda olan, kendilerinden çok beni düşünen, hayattaki tüm zorluklarla benimle birlikte mücadele eden; canımdan çok sevdiğim ANNEME VE ANNEANNEME ve rahmetli DEDEME,

Sevgisini ve ilgisini üzerimden eksik etmeyen, yeri geldiğinde en yakın arkadaşım, yeri geldiğinde sırdaşım, yeri geldiğinde dert ortağım olmayı başaran, hiçbir konuda beni yalnız bırakmayan, çok sevdiğim müstakbel eşim Cem AÇIKGÖZ'e teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından desteklenen 2018/288 nolu; "Probiyotik Kültür İmmobilizasyonu; Stabilite ve Optimizasyon Çalışmaları" adlı proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

05/07/2019

Begüm SIDAL

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **vi**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xii**

ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xiii**

BÖLÜM 1 ..... **1**

GİRİŞ **1**

BÖLÜM 2 ..... **3**

GENEL BİLGİLER **3**

2.1. Probiyotikler 3

2.1.1. Probiyotik Mikroorganizmaların Etki Mekanizması 5

2.1.1.1. Antimikrobiyal Maddelerin Üretimi Yoluyla Antagonizm 6

2.1.1.2. Bağırsak Epitel Hücrelerine Adezyon ve Patojenlerle Rekabet 7

2.1.1.3. Bağışıklık Sistemi Üzerine Etkiler 8

2.1.1.4. Toksin Üretiminin İnhibisyonu ve Toksin Reseptörlerine Etki 9

2.2. Prebiyotikler 9

2.3. Sinbiyotikler 12

2.4. İnsan Sağlığı Açısından Probiyotik Mikroorganizmalar ve Prebiyotik Maddeler 13

2.4.1. Gastrointestinal Sistem Hastalıkları ve Probiyotikler 13

2.4.2. Ürogenital Sistem Enfeksiyonları ve Probiyotikler 15

2.4.3. Karaciğer Hastalıkları ve Probiyotikler 16

2.4.4. Ağız Sağlığı ve Probiyotikler 17

2.4.5. Kanser ve Probiyotikler 18
2.4.6. Obezite 18
2.5. *Lactobacillus rhamnosus* 19
2.6. Bakteri İmmobilizasyonu 20
2.7. İmmobilizasyon Yöntemleri 21
2.8. Mikroenkapsülasyon 22
2.9. Taşıyıcı Seçimi 23
2.9.1. Alginat 24
2.9.2. Pektin 24
2.9.3. Karragenan 25
BÖLÜM 3 ..... **26**
MATERYAL VE METOT **26**
3.1. Materyal 26
3.1.1. Probiyotik Bakteri 26
3.1.2. Bakteri İmmobilizasyonunda Kullanılan Kaplama Materyalleri 26
3.1.3. Kullanılan Besiyerleri, Dilüsyon Sıvıları ve Çözeltiler 27
3.1.4. Kullanılan Cihaz ve Kimyasal Maddeler 27
3.2. Metot 28
3.2.1. Liyofilize Bakterilerin Aktive Edilmesi (Canlandırma) 28
3.2.2. Probiyotik Bakteri İmmobilizasyon Çalışmaları (Uygun Desteğin Seçimi) 28
3.2.2.1. Probiyotik Bakterinin Alginat Boncuklar İçinde Tutuklanması 29
3.2.2.2. Probiyotik Bakterinin Pektin İçinde Tutuklanması 30
3.2.2.3. Probiyotik Bakterinin Kappa-karragenan İçinde Tutuklanması 31
3.2.3. Canlı Probiyotik Bakteri Sayısının Belirlenmesi 32
3.2.4 İmmobilize Bakterilerin Kapsül Dışına Çıkması İçin Yöntem Seçimi 32
3.2.4.1. Stomacher İle Boncuk Dışına Çıkarma 33

3.2.4.2. Ultrasonik Homojenizatör İle Boncuk Dışına Çıkarma 33

3.2.4.3. Çalkamalı İnkübatör (Klipsli Çalkalayıcı) İle Boncuk Dışına Çıkarma 34

3.2.4.4. Vortex İle Boncuk Dışına Çıkarma 34

3.2.5. Alginat İmmobilizasyonunun Optimizasyon Çalışmaları 34

3.2.5.1. En Uygun Alginat Konsantrasyonunun Belirlenmesi 35

3.2.5.2. En Uygun $CaCl_2$ Konsantrasyonunun Belirlenmesi 35

3.2.5.3. En Uygun Yüklenen Bakteri Sayısının Belirlenmesi 35

3.2.6. Ortam pH'nın Serbest ve İmmobilize Canlı Probiyotik Bakteri Sayısına Etkisi .. 31

3.2.7. Simüle Edilmiş (Yapay) Mide Özsuyu ve Safra Tuzunun Serbest ve İmmobilize Canlı Probiyotik Bakteri Sayısına Etkisi 36

3.2.8. İstatistiksel Analizler 37

BÖLÜM 4 ..... **38**

BULGULAR **38**

4.1.İmmobilizasyon İçin Uygun Destek Maddesinin Belirlenmesi 38

4.2. İmmobilize Bakterilerin Kapsül Dışına Çıkması İçin Yöntem Seçimi 39

4.3. Alginat İmmobilizasyonunun Optimizasyon Çalışmaları 40

4.3.1. En Uygun Alginat Konsantrasyonunun Belirlenmesi 40

4.3.2. En Uygun $CaCl_2$ Konsantrasyonunun Belirlenmesi 41

4.3.3. En Uygun Yüklenen Bakteri Sayısının Belirlenmesi 42

4.4. Ortam pH'nın Serbest ve İmmobilize Canlı Probiyotik Bakteri Sayısına Etkisi 43

4.5. Simüle Edilmiş (Yapay) Mide Suyu ve Safra Tuzunun Serbest ve İmmobilize Canlı Probiyotik Bakteri Sayısına Etkisi 44

BÖLÜM 5 ..... **46**

TARTIŞMA **46**

KAYNAKLAR **51**

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Temel İmmobilizasyon Yöntemleri 21

Şekil 3.1. Alginat kapsüller 30

Şekil 3.2. Pektin kapsüller 31

Şekil 4.1. İmmobilize Bakterilerin Kapsül Dışına Çıkması İçin Yöntem Seçimi 40

Şekil.4.2. Alginat Konsantrasyonun İmmobilizasyona Etkisi 41

Şekil.4.3. $CaCl_2$ Konsantrasyonun İmmobilizasyona Etkisi 42

Şekil.4.4. Yüklenen Bakteri Sayısının İmmobilizasyona Etkisi 43

Şekil 4.5. Ortam pH'nın Serbest ve İmmobilize Canlı Probiyotik Bakteri Sayısına Etkisi 44

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Başlıca probiyotik mikroorganizmalar 4

Çizelge 2.2. Gıdalarda kullanılan başlıca prebiyotikler..... 11

Çizelge 4.1. Alginat ve Pektin İçin Bakteri İmmobilizasyon Etkinliği 39

Çizelge 4.2. Yapay Mide Suyu ve Safra Tuzu ile Muamele Edilmiş Bakterilerin Yaşayabilirlikleri (%)..... 45

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Kelime anlamı olarak, Yunanca'da "için" anlamına gelen "pros" ve "canlı" anlamına gelen "bios" kelimelerinden türemiş olan probiyotik (yaşam için) terimi, 2001 yılında FAO (Gıda ve Tarım Organizasyonu) ve WHO (Dünya sağlık Örgütü) onayı ile uzman bir grup tarafından "yeterli dozda tüketildiklerinde konakçının sağlığına faydalı olan canlı mikroorganizmalar" olarak tanımlanmıştır. Son on yılda probiyotik kullanımının önemi giderek artmıştır (Atia, vd., 2017). Laktik asit bakterileri, sindirim sistemi üzerine olan yararlı etkilerinden dolayı en yaygın kullanılan probiyotik mikroorganizmalardır.

Geçtiğimiz otuz yıldan beri daha fazla araştırılan probiyotikler, enfeksiyon hastalıkları tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin alternatifi olabileceği düşünülmektedir ve bağırsaktaki mikrobiyotanın dengelenmesinde son derece önemlidirler. Probiyotik bakteriler, endüstride sağlık açısından belirlenmiş faydaları nedeniyle dondurma, yoğurt, yumuşak ve sert peynirler, dondurulmuş sütlü tatlılar gibi pek çok gıdaya katılmaktadırlar (Prasanna & Charalampopoulos, 2019). *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium*'lar başlıca probiyotik bakteriler olarak bilinmektedir. Probiyotik bakterileri içeren gıdalar, fonksiyonel gıdaların önemli bir bölümünü oluşturmaktadırlar. Sağlık açısından faydalı etki göstermeleri için günde 100g'dan fazla fonksiyonel gıda (içerisinde en az 10^7 CFU/g probiyotik bakteri içeren) tüketmek

gerekmektedir (Trabelsi, Bejar, Ayadi, Chouayekh & Kammoun, 2013). Ayrıca yapılan pek çok çalışmada probiyotik bakterilerin çevre koşullarına karşı hassas olduğu saptanmıştır. Probiyotik bakteriler tüketildiklerinde gastrointestinal sistemi geçerken oldukça düşük pH'dan, sindirim enzimlerinden ve safra tuzlarından etkilenirler (Shi vd., 2013). İlaveten probiyotik bakteriler yüksek sıcaklık, düşük pH, yüksek ozmotik basınç, dondurulma gibi dış çevresel koşullardan olumsuz olarak etkilenmektedirler. Bu nedenle probiyotik bakterilerin mikroenkapsülasyon yöntemi ile immobilize edilme çalışmaları gündeme gelmiştir. Bu sayede bakteriler olumsuz çevre şartlarından korunmaktadırlar. Enkapsülasyonda en yaygın olarak kullanılan materyal alginattır. Alginat non-toksik, ucuz, kolay uygulanabilir bir materyaldir ve gıda katkı maddesi olarak kabul edilmektedir (Jantarathin, Borompichaichartkul & Sanguandeekul, 2017).

Yapılan bu tez çalışmasında, probiyotik bir bakteri olan *Lactobacillus rhamnosus* bakterisinin farklı yöntemlerle immobilizasyonu, immobilizasyon şartlarının optimizasyonu, kapsül dışına bakterilerin çıkarılmasında farklı yöntemlerin karşılaştırılması ile immobilize bakterilerin serbest haldeki bakterilere kıyasla farklı pH'lara (gıdalarda depolama süresince pH dayanıklılığını belirlemek üzere), mide özsuyu ve safra tuzuna (insan vücudunda canlı kalabilirliğini belirlemek üzere) karşı direncinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Probiyotikler

Probiyotikler, canlı mikroorganizmalar olup, yeterli oranlarda vücuda alındıklarında konak sağlığı üzerinde yararlı özellikler gösterirler (Şener, Temiz, Toğay & Bağcı, 2008). Probiyotik mikroorganizmalar bağırsak orijinli olup, çeşitli gıdaların içerisinde doğal olarak bulunabilirler veya gıda üretimi esnasında ilave edilebilirler. Probiyotik mikroorganizmalar açısından zengin gıdalara örnek olarak peynir, yoğurt, kefir, kımız gibi fermente süt ürünleri, turşu, çiğ sucuk, şarap, bira verilebilir (Yağcı, 2002). Gıdaların 10^6 kob/g veya daha fazla sayıda probiyotik bakteriyi canlı olarak içermeleri, içinde yer aldıkları gıdaların işleme ve depolama süresince canlı kalabiliyor olmaları ve vücuda alınan probiyotiklerin gastrointestinal sisteme canlı olarak ulaşabilmeleri gerektiği bildirilmektedir. Probiyotik olarak bakteri, maya ve küf grubu mikroorganizmalar bulunmasına rağmen, laktik asit bakterileri (*Lactobacillus, Leuconostoc, Streptococcus, Pediococcus, Enterococcus, Bifidobacterium* türleri) ve *Saccharomyces boulardii* yaygın bir kullanıma sahiptir. *S.boulardii*, ilk defa Boulard isimli bir araştırıcı tarafından, Endonezya'da yetiştirilen tropikal bir meyvenin kabuğundan izole edilerek tanımlanan nonpatojenik bir maya türüdür (Dinleyici, Eren, Özen, Yargıç & Vandenplas, 2012).

İnsanlarda gastrointestinal sistem (GİS) doğum anında steril iken, GİS mikrobiyotası doğumdan hemen sonra oluşmaya başlar ve zamanla değişerek normal mikrobiyota gelişir. Doğumdan sonra anne sütü alımı dolayısıyla Bifidobakteriler, 1. haftanın sonunda yenidoğan feçesinde (10^{10} - 10^{11}/g gaita) epeyce bulunmakta olup, bağışıklık sisteminin aktive edilmesinde rol oynamaktadırlar. (Vanderhoof & Rosemary, 2002; İnanç, Şahin, & Çiçek, 2005). Başlıca probiyotik mikroorganizmalar Çizelge 1'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.1. Başlıca probiyotik mikroorganizmalar (Özbaş, 1995; Fijan, 2014).

***Lactobacillus* türleri**	***Bifidobacterium* türleri**	***Bacillus* türleri**	***Pediococcus* türleri**
L. rhamnosus	*B. infantis*	*B. coagulans*	
L. acidophilus	*B. animalis* subsp. *lactis*	*B. subtilis*	*P. acidilactici*
L. plantarum	*B. bifidum*	*B. cereus*	*P. cerevisiae*
L. casei	*B. longum*	*B. licheniformis*	*P. pentosaceus*
L. delbrueckii subsp.	*B. breve*	*B. coagulans*	
L. bulgaricus	*B. termophilum*		
L. johnsonii			
L. fermentum			
L. reuteri			
L. lactis			
L. brevis			
***Streptococcus* türleri**	***Bacterioides* türleri**	***Propionibacterium* türleri**	***Leuconostoc* türleri**
S. cremoris,	*B. capillus*		
S. thermophilus	*B. suis*	*P. shermanii*	*L. mesenteroides*
S. intermedius	*B. ruminicola*	*P. freudenreichii*	
S. lactic	*B. amylophilus*		
S. diacetilactis			
Küf Türleri		**Maya Türleri**	
Aspergillus niger		*Saccharomyces cerevisiae*	
Aspergillus oryzae		*Saccharomyces boulardii*	
		Candida torulopsis	

Probiyotik mikroorganizmalar, insan sağlığı üzerinde birçok yaralı etkilere sahiptirler. Probiyotiklerin çocuk ishali, antibiyotiğe bağlı diyare, nekrotizan enterokolit, *Clostridium difficle'*ye bağlı nüks eden kolit, irritabl bağırsak sendromu,

Helicobacter pylori enfeksiyonu, ürogenital enfeksiyonlar, cerrahi enfeksiyonlar, gingivitis, oral hastalıklar gibi birçok klinik rahatsızlıkta etkili oldukları, bağışıklık sistemini stimüle ettikleri, antitümöral ve antikanserojen etkiye sahip oldukları bilinmektedir (Pal & Jadhav, 2013; Salminen, Deighton, Benno, & Gorbach, 1998; Kınık ve Gürsoy, 2006).

Probiyotik canlı kültürler, fermente süt ürünlerinde ve probiyotik takviyeli gıdalarda bulunur. Ek olarak, dondurularak kurutulmuş halde bakteri içeren tabletler, kapsüller, tozlar ve poşetler de piyasada bulunmaktadır. Probiyotik kültürleri içeren gıdalarda karşılaşılan en büyük sorunlardan birisi de kullanılan mikroorganizmaların canlılıklarını devam ettirememeleridir. Bu nedenle bu mikroorganizmaların dayanıklılığını arttırmak üzere, immobilize edilerek kullanımları avantaj sağlamaktadır. Gıda alanında en çok tercih edilen immobilizasyon tekniklerinden birisi de mikroenkapsülasyon yöntemidir (Champagne & Fustier, 2007; Argin, 2007). Genel olarak gıda bileşenleri, enzimler, hücreler veya mikroorganizmaların karbonhidrat veya protein karakterindeki mikrometrik ölçekteki kapsüller (boncuklar) içerisinde tutuklanması demek olan mikroenkapsülasyon işlemi, probiyotik mikroorganizmalar için de yaygın olarak kullanılmaktadır (Öztürk, 2006; Hsieh vd., 2009). Mikroenkapsülasyon ile ilgili yapılan güncel çalışmalarda, probiyotik mikroorganizmanın hapsedildiği kapsül içerisine aynı zamanda probiyotiklerin besin öğeleri olan prebiyotik katkı maddelerinin de yerleştirilmesi ile sinbiyotik etki yaratılması amaçlanmaktadır. Böylece konak vücuduna alındıktan sonra gastrointestinal sistemde birlikte lümene çıkışları sağlanarak, sinbiyotik etkiyi oluşturmaları beklenmektedir (Ünal & Erginkaya, 2010).

2.1.1. Probiyotik Mikroorganizmaların Etki Mekanizması

Moleküler ve genetik çalışmalar, probiyotiklerin yararlı etkilerinin temellerinin belirlenmesini sağlamıştır, bunlar başlıca dört mekanizmayı içermektedir:

- Antimikrobiyal maddelerin üretimi yoluyla antagonizm,
- Kolonize olma ve besin maddeleri için patojenlerle rekabet etme,
- Konağın immünomodülasyonu,
- Bakteriyel toksin üretiminin inhibisyonu (Markowiak & Slizewska, 2017)

2.1.1.1. Antimikrobiyal Maddelerin Üretimi Yoluyla Antagonizm

Probiyotik mikroorganizmalar, intestinal sistemde yer alan ve dışarıdan giren zararlı bakterilere karşı antagonistik etki yaratan birçok donanıma sahiptirler. Bu bakteriler bu etkiyi en çok da üretmiş oldukları antimikrobiyal bazı bileşikler (bakteriyosinler, organik asitler, hidrojen peroksit, diasetil, reuterin gibi) ile sağlamaktadırlar. *S. boulardii*'nin, *Candida albicans, Escherichia coli, Salmonella typhi, Shigella gibi* bakterilerin üremesini inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Sezen, 2013).

Bakteriyosinler, laktik asit bakterileri tarafından ribozomal olarak sentezlenen ve diğer bakterilere karşı antagonistik etkili olan antimikrobiyal peptitlerdir (Yang, Fan, Jiang, Doucette & Fillmore, 2012). Reis, Paula, Casarotti & Penna (2012) derleme çalışmalarında, çeşitli araştırmalarda farklı laktik asit bakterilerince üretilen bakteriyosinlerin *Salmonella, Shigella, Listeria monocytogenes, Staphylococucus aureus, Bacillus cereus* gibi gıda kaynaklı patojenler üzerinde inhibe edici etkilerini gösteren araştırmaları sunmuşlardır. Bifidobakterilerin intestinal sistemdeki faaliyetleri esnasında antimikrobiyal peptidler ürettiği ve bu bileşiklerin *Bacillus cereus, Salmonella typhosa, Escherichia coli, Pseudomonas fluorescens, Shigella dysenteriae, Staphylococcus aureus* gibi bazı mikroorganizmaların aktivitelerini engellediği Sezen (2013) tarafından belirtilmiştir.

Gliserol dehidratazın etkisi ile gliserolün dönüşümü sonucu meydana gelen reuterin, heterofermantatif *L. reuteri* bakterisi tarafından üretilir. Antibakteriyel, antifungal, antiviral ve antiprotozoal etkilere sahip geniş spektrumlu bir maddedir.

Yapılan çalışmalarla *L. reuteri*'nin *Candida, Torulopsis, Saccharomyces, Aspergillus* ve *Fusarium* üzerinde antifungal (Yangılar, 2015), *Salmonella, Shigella, Clostridium, Staphylococcus, Listeria* üzerinde ise antibakteriyal etkiler gösterdiği belirtilmiştir (Evren, Albayram & Apan, 2006).

Probiyotik mikroorganizmalar, laktik asit, asetik asit gibi organik asitler oluşturarak bulundukları ortamın pH'ını düşürürler. Yarattıkları bu asidik çevre kendilerine zarar vermezken, intestinal patojenler için uygun olmayan bir çevre yaratarak çoğalmalarını engeller. Hidrojen peroksit (H_2O_2) de laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakterisit özelliğe sahip bir bileşiktir. H_2O_2 üretimi, gıda kaynaklı patojenlerin büyümesini önleyebilir ve gıda muhafazasında yararlı olabilir (Reis vd., 2012).

Lactobacillus acidophilus, intestinal patojenlere karşı antibakteriyel etki gösteren hidrojen peroksit ve laktik asit ile farklı bakteriyosinler (asidolin, asidofilin, laktosidin) üretirler (Sezen, 2013).

2.1.1.2. Bağırsak Epitel Hücrelerine Adezyon ve Patojenlerle Rekabet

Probiyotik kültürlerin bağırsak hareketleri ile atılmaması için bağırsak epitel hücrelerine yapışması gerekmektedir. Bu mekanizma, patojenleri bloke edebilir ve enterik patojenlere karşı antagonistik etki yaratarak konağın sağlık durumu üzerine olumlu bir etki yaratır. Ayrıca, probiyotik mikroorganizmaların epitel hücrelere yapışması, immünolojik modülasyona yol açabilir. Alternatif olarak, bazı çözünür bileşenlerin salınımı, immünolojik hücrelerin doğrudan veya dolaylı (epitelyal hücreler yoluyla) aktivasyonuna neden olabilir. Bağırsakta *Lactobacillus* kolonizasyonunun azalması ile ülseratif kolit ve viral diyare oluşabileceği düşünülmektedir (Markowiak & Slizewska, 2017; Önal, Beyatlı & Aslım, 2005).

Probiyotiklerin, bağırsak epiteline yapışması ile patojen bakterilerle rekabete girmiş olurlar ve zararlı bakterilerin bağırsak duvarına adezyonuna engel olarak onları dışarıda bırakmış olurlar. Gastrointestinal sistem hücrelerine tutunmada, bakteri hücre yüzeyinde yer alan bileşenler (protein, karbonhidrat ve bunların çeşitli kombinasyonları) yardımcı olmaktadır. Yapılan bir çalışmada *S. boulardii*'in alyuvarlardaki *Entamoeba histolytica* reseptörleri için yarışa girdiği ve trofozoit sayısında düşüş sağladığı saptanmıştır (Grand & Watkins, 1976; Tuomola, Ouwehand & Salminen, 1999).

Probiyotikler, patojen bakterilerin gereksinim duydukları bazı besin maddeleri için rekabete girerek, patojenlerin üremelerini engelleyebilirler. Örnek olarak probiyotik bir maya türü olan *S. boulardii, i*nsan normal bağırsak mikrobiyotasında yer alan ve antibiyotik tedavisi sonrası ciddi gastrointestinal enfeksiyonlar yaratabilen *Clostridium difficile* bakterisinin beslenmek için gereksinim duyduğu monosakkaritleri tüketerek üremelerine mani olurlar (Castagliuolo, Riegler, Valenick, La Mont, & Pathoulakis, 1999; Önal vd., 2005)

Probiyotik bakteriler ayrıca bağırsak içerisinde patojen bakterilerin besin elementlerini kullanmalarına da engel olabilmektedir. Örneğin; hemen tüm bakteriler için çok önemli bir besin öğesi olan demire ihtiyaç duymayan *Lactobacillus* cinsi içinde yer alan *L. delbrueckii*, demir hidroksitin yüzeyine bağlanır ve diğer bakterilerin bu elemente ulaşmasına engel olur (Önal vd., 2005).

2.1.1.3. Bağışıklık Sistemi Üzerine Etkiler

Probiyotik bakteriler de dahil olmak üzere bağırsak mikrobiyotasının immünomodülatör etkisi üç şekilde açıklanabilir:

1- Çevresel antijenlere karşı immünolojik tolerans durumunun indüksiyonu ve korunması,

2- Bakteriyel ve viral kaynaklı patojenlere karşı immünolojik reaksiyonların indüklenmesi ve kontrolü,

3- Kendiliğinden agresif ve alerjik reaksiyonların inhibisyonu.

Probiyotik kaynaklı immünolojik uyarım, immünoglobulinlerin üretimi, makrofaj ve lenfositlerin aktivitesinin artması ve interferon üretiminin stimülasyonu ile de ortaya çıkar. Probiyotikler konjenital ve edinilmiş immünolojik sistemi, konakçının özel hücreleri tarafından tanınan metabolitler, hücresel duvar bileşenleri ve DNA yoluyla etkileyebilir. Laktik asit bakterilerinin hücre duvarları makrofaj aktivitesini uyarır (Markowiak & Slizewska, 2017).

2.1.1.4. Toksin Üretiminin İnhibisyonu ve Toksin Reseptörlerine Etki

Probiyotikler patojenlerin gastroitestinal sistemde toksin üretimini de baskılayabilir. Tavuklarda yapılan bir çalışmada, in vitro ko-kültür sisteminde, *L. acidophilus* ve *L. fermentum* bakterilerinin ortam pH'ını düşürerek, *Clostridium perfringens*'in büyümesini ve A-toksin üretimini inhibe ettiği ve virülansını zayıflatma potansiyeli gösterdiği bulunmuştur (Guo vd., 2017). Probiyotikler, bağırsaktaki toksin reseptörünü enzimatik bir mekanizma yoluyla bozabilir, toksin reseptörlerini modifiye edebilir ve toksin aracılı hastalıkları bloke edebilir. Bağırsakta bu şekilde toksin reseptörünü bozarak etki gösteren *Saccharomyces boulardii*, konağı *Clostridium difficile* bağırsak hastalığına karşı koruyabilir (Bajaj, Ingmar, Claes & Lebeer, 2015).

2.2. Prebiyotikler

Prebiyotikler, kolonda bulunan anaerobik bakteriler tarafından fermente edilen, bu bakterilerin büyümesini ve/veya aktivitesini seçici bir şekilde uyaran, konak

tarafından sindirilemeyen gıda bileşenleri olarak tanımlamıştır (Hoseinifar, Ringo, Shenavar & Esteban, 2014). Bağırsak mikrobiyotasını modifiye etmek için prebiyotikler güçlü bir potansiyele sahiptir, ancak bu modifikasyonlar bireysel suşlar ve türler düzeyinde meydana gelir. Ayrıca bağırsak ortamı, özellikle de pH, türler arası rekabetin sonucunun belirlenmesinde kilit bir rol oynar. Hem etkinlik hem de güvenlik nedenlerinden dolayı, insan sağlığına fayda sağlamak amacıyla prebiyotiklerin seçimi bakteri türlerinin özellikleri göz önüne alınarak yapılmalıdır. Meyve, sebzeler, tahıllar ve diğer yenilebilir bitkiler, potansiyel prebiyotikleri oluşturan karbonhidrat kaynaklarıdır. Domates, enginar, muz, kuşkonmaz, çilek, sarımsak, soğan, hindiba, yeşil sebzeler, baklagiller ve ayrıca yulaf, keten tohumu, arpa ve buğday başlıca prebiyotik kaynaklarıdır. Endüstriyel olarak üretilen bazı prebiyotikler; laktuloz, galaktooligosakaritler, fruktooligosakaritler, maltooligosakaritler, siklodekstrinler ve laktosakkarrozdur. Laktuloz üretilen oligosakaritlerin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. İnülin gibi fruktanların endüstride en çok kullanılan prebiyotikler olduğu bilinmektedir (Markowiak & Slizewska, 2017).

Prebiyotik olan oligosakkaritler, insan sağlığını tehdit eden patojenlerin intestinal sisteme tutunmalarına engel olurlar, diyetsel posa olma özellikleriyle de bu zararlıların feçes yoluyla atılmalarını sağlarlar. Prebiyotikler kolonda *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşları tarafından parçalanıp fermente edilmektedirler (Marx, Winkler & Hartmeier, 2000). Oligosakkaritlerin bir kısmı anne sütünde doğal olarak bulunup prebiyotik özellik sergilmektedir ve bu sayede bebeği pek çok hastalığa karşı korumaktadır (Macfarlane, Steed & Macfarlane, 2008). Gıdalarda yaygın olarak kullanılan başlıca prebiyotikler Çizelge 2.2.'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.2. Gıdalarda kullanılan başlıca prebiyotikler (Demirci vd., 2017).

Oligosakkaritler	**Diğerleri**
Fruktooligosakkaritler	İnülin
Galaktooligosakkaritler	Laktuloz
Glukooligosakkaritler	Laktosukroz
Ksilooligosakkaritler	Raftilin
İzomaltooligosakkaritler	Oligomat
Soya oligosakkaritleri	Palatinoz
Gentiooligosakkaritler	Pirodekstrinler
Arabinoksilooliosakkaritler	Sorbitol
Pektik oligosakakritler	İzomaltuloz
Kitosan oligosakakritler	Palatinoz
Mannooligosakakritler	
Neoagarooligosakakritler	
Fosforil oligosakakritler	
Rafinoz oligosakkaritler	
Pektik oligosakakritler	
Kitosan oligosakakritler	

Prebiyotikler insan beslenmesinin yanı sıra, hayvan rasyonlarında da pek çok özelliklerinden dolayı kullanımı tercih edilen ürünlerdir. Bu özelliklerin başında hayvan sindirim sisteminde pH regülasyonunu sağlamak, bağırsak sistemindeki faydalı mikroorganizmaların üremesini ve stabilitesini sağlamak gelmektedir (Tunç, 2007). 2008 yılında yapılmış bir çalışma, inülin, galaktooligosakkarit, fruktooligosakkarit gibi pek çok prebiyotik bir laktik asit bakterisine, kolonize olması ve pH düşürme yeteneğini geliştirmesi amacıyla verilmiştir. Verilen prebiyotiklerin hepsi bu özellikler üzerinde pozitif etki sağlamıştır ve en iyi sonucu ksilooligosakkarit vermiştir (Şener vd., 2008)

2.3. Sinbiyotikler

Sinbiyotikler, insan bağırsak sisteminde bulunan yararlı bakteriler (probiyotikler) ve bu bakterilerin üremesini ve kolonizasyonunu destekleyen prebiyotiklerin kombinasyonuyla elde edilen gıda takviyeleridir (Douglas & Sanders, 2008). *Bifidobacterium'*ların veya *Lactobacillus'*ların oligosakkaritler, inülin yahut şeker alkolleriyle karıştırılmasıyla elde edilirler (Gülmez & Güven, 2002). Sinbiyotik karışımlar sindirim sisteminde bakterilerin daha iyi kolonize olmasını sağlamıştır.

2002 yılında yapılan bir çalışmada, *Bifidobacterium* ve fruktooligosakkaritten meydana gelen sinbiyotik, yoğurda ilave edilerek bireylere verilmiştir. Sonuçlar takviye almayan bireylere göre çok daha başarılı bulunmuştur (Rastall & Maitin, 2002). Başka bir örnek çalışmada ise, 100 kişiden meydana gelen ve gastrointestinal sistem rahatsızlıkları yaşayan bireyler 50'şerli 2 gruba ayrılmıştır. Bir gruba plasebo verilirken, diğer gruba sinbiyotik verilmiştir. 30 gün sonra sinbiyotik kullanan grubun şikayetleri plasebo uygulanan grubun şikayetlerine göre ciddi anlamda azalmıştır (Waitzberg vd., 2013). Bıldırcın rasyonuna eklenen sinbiyotik takviyesi sonucunda, bağırsak mikrobiyotasında ve antibiyotiklerin istenmeyen etkileri üzerinde pozitif değişiklikler meydana geldiği bulunmuştur (Şener vd., 2008). Ayrıca etlik piliç yemlerine sinbiyotik eklenmesinin çekumdaki koliform bakterilerinin sayısında belirgin bir azalma olduğu bildirilmiştir (Erdoğan, Erdoğan, Aslantaş & Çelik, 2010).

2.4. İnsan Sağlığı Açısından Probiyotik Mikroorganizmalar ve Prebiyotik Maddeler

2.4.1. Gastrointestinal Sistem Hastalıkları ve Probiyotikler

Probiyotik mikroorganizmaların sağlık için yararlı pek çok etkisi bildirilmiştir (Tok & Aslım, 2007). Probiyotiklerin bağırsak mikrobiyotasının rekombinasyonu, sindirim sistemi hastalıklarının önüne geçilmesi bakımından çok çeşitli etkileri bulunmaktadır (Yılmaz, 2004).

Süt Şekeri Hassasiyeti (Laktoz İntoleransı): Laktoz intoleransı, dünya nüfusunun dörtte üçünü kapsayan bir rahatsızlıktır (Turan & İlter, 2007). İnsidansın bu kadar yüksek olması, bilim adamlarını bu konu üzerinde çalışmaya sevk etmiştir. Yapılan araştırmalardan birisinde yoğurt tüketen bireylerin, süt tüketen bireylere oranla çok daha az sindirim zorluğu yaşadığı, bu tablonun görülme sebebinin ise laktik asit bakterileri tarafından laktozun sindirilmesi olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca kolon mikrobiyotasının hızlı bir şekilde uyum sağlayarak intestinal sistemde sindirilemeyen laktozun da önemli bir bölümünün kullanılabildiği ifade edilmiştir (Zubillaga vd., 2001).

Diyare (İshal): İshal, gelişmekte olan ülkelerde hayatını sürdüren beş-altı yaş çocuklarda en önemli hastalık ve ölüm etmenlerinden biridir (Kutlu, 2001). Diyare çoğu zaman feçesin standart şeklinin yok olması, miktar ya da tuvalete çıkma sıklığının artması şeklinde ifade edilmektedir (Eroğlu, 2008). Günümüzde adölesan ölümü sebeplerinin başında diyare gelmektedir (Öztürk, 2007). Pek çok ülkede görülen diyarenin tedavisinde probiyotiklerin kullanımının fayda sağlayabileceği vurgulanmıştır (İnanç vd., 2005).

287 çocuğun 140'ı plasebo olmak kaydıyla, *Lactobacillus rhamnosus* verilmesiyle akut ishal rahatsızlığı arasındaki ilişki incelenmiş, sonucunda çocukların probiyotik alan grubunda tuvalete çıkma sıklığı ve ishal miktarı oldukça azalmıştır (Guandalini vd., 2000).

466 vaka üzerinde yapılan bir araştırmada, antibiyotik ilişkili diyarenin görülme sayısının probiyotik suş kullanımı sayesinde belirgin bir oranda düşürüldüğü ve diyare görülme riskinin %400 oranında azaltıldığı bulunmuştur (Erdeve, Tıraş, Çamurdan, Tanyer & Dallar, 2002).

İnflamatuar Bağırsak Hastalıkları: Bu hastalıklar, gastrointestinal sistemde tuttukları bölgelere göre iki gruba ayrılmaktadırlar.

Ülseratif Kolit: Kolonda mukoza tabakasında sınırlı yaralar ile karakterize olmuş iltihabi bir rahatsızlıktır (Özden, 2007). Yapılan bir çalışmada, 25 vakada ülseratif kolit tedavisinde mesalamine ek olarak probiyotik mikroorganizmalardan *Sacchoromyces boulardii* kullanılmış ve hastalığın görülme oranının %68 azaldığı rapor edilmiştir (Guslandi, Giollo & Testoni, 2003).

Crohn Hastalığı: Crohn hastalığı, insanlarda sindirim sisteminin ağızdan anüse kadar olan herhangi bir bölgesini tutan, sebebi bulunamamış, kalıcı olabilen, inflamatuar bir rahatsızlıktır. Bu rahatsızlıktan muzdarip olan hastalardan oluşan 32 kişilik bir çalışmada *S. boulardii'*nin mesalamine ek olarak verilmesi ile kişilerin hastalığı tekrar geçirme oranlarının azaldığı gözlemlenmiştir (Guslandi vd., 2003).

Nekrotizan Enterokolit: Yenidoğan nekrotizan enterokolit, neonatal dönemin sebebi bulunmayan ciddi bir sindirim sistemi hastalığıdır. Görülme sıklığı bölgeden bölgeye, hastaneden hastaneye değişmektedir (Çetinkaya & Köksal, 2004). 367 bebekten oluşan bir araştırmada, 180 bebek *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* içerikli mamadan ve anne

sütünden oluşan beslenme düzenine tabi tutulmuştur. Çalışma sonucunda bebeklerde bu hastalığın %63 gibi ciddi bir oranda görülmediği tespit edilmiştir (Lin vd., 2005).

Konstipasyon: Bireylerin tuvalete çıkma alışkanlıklarında süre, miktar ve kıvam açısından meydana gelen; gaitanın (feçes) kuru, sert ve zor atılması durumudur (Gürsoy, Kınık & Gönen, 2005). Mikrobiyotasında *Clostridia, Bacteroides* ve *Bifidobacterium* oranları düşen bireyler genellikle konstipasyondan muzdariptirler ve *Lactobacillus* suşlarının gıdalarla birlikte tüketiminin kabızlık tedavisinde ve rahatsızlığa bağlı şikayetlerin hafifletilmesinde pozitif etkileri olduğu bulunmuştur (Coşkun, 2006; Gürsoy vd., 2005).

***Helicobacter pylori* Kaynaklı Enfeksiyon:** *H. pylori* patojeni orijinli, günümüzde en sık gözlenen ve dünya nüfusunun neredeyse yarısından fazlasının karşı karşıya geldiği hastalıklardan biridir (Özden, 2007). Amerika' da yapılan bir çalışmada doğal florasında laktik asit bakterileri içeren yoğurtlarda bir gün boyunca bekletilen *Helicobacter pylori* şuşlarının tamamının üremesinin durdurulduğu tespit edilmiştir. *L. ferentoshensis, L. crispatus, L. kefiri* gibi birçok mikroorganizma, bu yoğurttan elde edilmiş ve bulunan mikroorganizmaların çeşitli yollarla *Helicobacter pylori* üremesini engellediği bulunmuştur (Oh, Osato, Bennett & Hong, 2002).

2.4.2. Ürogenital Sistem Enfeksiyonları ve Probiyotikler

Kadın üreme sistemi mikrobiyatası, pek çok bakteriden oluşmuştur ve bu bakteriler birbirleriyle uyum içerisinde bulunmaktadır. Özellikle kadınlarda premenapozda, *Lactobacillus*'lar vajen mikrobiyotasında en baskın olan bakteri türüdür. Probiyotik bakteriler idrar yolları enfeksiyonunu ve vajinada görülen çeşitli hastalıkları önleyici etkiler göstermektedir. Patojen mikroorganizmaların ürogenital sistemde normalden çok üremelerine engel olan pek çok madde üretmektedirler ve uygun bölgelerde kolonize olmak amacıyla patojenlerle rekabete girmektedirler. Zararlı

organizmaların inhibisyonu için H_2O_2 (hidrojen peroksit) ile bakteriyosin üretmektedirler. Kişilerin bağışıklık sistemini regüle ederler ve vajen mikrobiyotasında pH'ı sabit tutarlar (Vrese & Schrezenmeir, 2002).

Üriner sistem kendine has bir mikroflora barındırmaktadır. Mikrobiyotada meydana gelen bakteri kolonizasyonu değişimi, ürogenital sistemde hastalıkların meydana gelmesine sebebiyet verir. Ürogenital sistemde meydana gelen enfeksiyonların yok edilmesinde hidrojen peroksit sentezleyen mikroorganizmaların varlığı elzemdir (Coşkun, 2006).

Düzenli bir şekilde yoğurt tüketen bireylerde *Candida*'ya bağlı vajnitin iyileştiği bulunmuştur. Vajinada *Lactobacillus* türleriyle beraber maya bulunursa bazı suşlar maya çoğalmasını yok edebilmektedir (Özden, 2007).

2.4.3. Karaciğer Hastalıkları ve Probiyotikler

Hepatik ensefalopati, ciddi karaciğer bozukluğu olan hastalarda görülen, farklı nedene bağlı bir nörolojik yahut metabolik hastalık olmaksızın, bir dizi nöropsikiatrik değişikliklerle karekterize bir sendromdur (Solga, 2003; Hotten vd., 2003). Ani gelişen veya kalıcı karaciğer hasarı bulunan vakaların her birinde ensefalopati gözlemlenebilmektedir. Bazı vakalarda hastalık normal seyrinde giderken bazılarında ise belirtiler daha hafif görülebilmektedir. Hastalığın hafif seyrettiği dönemde probiyotik mikroorganizmaların kullanımı hastalığın iyileştirilmesinde olumlu sonuçlar vermiştir. Probiyotik kullanımı, pH'yı aside kaydırarak, kan NH_3 (amonyak) düzeylerini azaltarak, bakteriler tarafından sentezlenen üreaz enziminin işlevselliğini azaltarak, ince bağırsakta bulunan villuslardaki emilimi ve toksik maddelerin alımını azaltarak hepatik ensefalopati semptomlarının iyileşmesini sağlayabilmektedir (Solga, 2003).

Hepatik ensefalopati tanısı konmuş hastalara probiyotik olduğu bilinen bir bakteri suşu veya laktuloz gıda takviyesi olarak verilmiş ve kişilerin kandaki amonyak düzeyleri takibe alınmıştır. Probiyotik suş, amonyak düzeyini düşürmüş ve bu sayede hastaların zihinsel ve bedensel aktivitelerinde iyileşmeler sağlamıştır. Uzun süreli kullanımda ise laktuloz alan bireylerde ishal gözlemlenirken, probiyotik alan bireylerde ishal de dahil olmak üzere hiçbir yan etki görülmemiştir (Zhao vd., 2004).

2.4.4. Ağız Sağlığı ve Probiyotikler

Diş eti hastalıkları (periodontal hastalık), dişi çevreleyen ve destekleyen dokuları etkileyen bir enfeksiyon hastalığıdır. Hiç çürüğü olmayan dişler bile bu hastalık nedeniyle kaybedilebilmektedir. Periodontal hastalıklar, bir veya birçok dişi etkileyebilen; çocuklarda, büyüme çağındaki bireylerde, erişkinlerde ve yaşlılarda görülebilen toplumdaki en yaygın kronik hastalıklardır. Bakterilerin asit üretmesi, diş minesinde mineral kaybına neden olması ve diş çürüğünün oluşmasına yol açmaktadır (Bowen & De Paola, 2000; Johansson, 2002).

Ağız mikrobiyotasında dengenin önemi ve dengenin sağlanmasında probiyotik kullanımı ile çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle *L. rhamnosus*, ağızda bulunan pek çok patojene karşı inhibe edici özellik sergilemiştir. Çocuk deneklerde süt ile birlikte *L. rhamnosus* kullanımının, diş çürümelerini ve *Streptococcus* oranını önemli sayıda düşürdüğü görülmüş bu nedenle adölesanlarda ağız sağlığı için probiyotik takviyesi önerisi yapılmıştır (Nase vd., 2001).

2.4.5. Kanser ve Probiyotikler

İnsanlarda gözlemlenen kanserlerin başlıca sebeplerinden biri fiziki çevreden maruz kalınan kanserojen maddelerdir. Bağırsak sisteminde bulunan faydalı bakteriler kanserojenlerin inhibisyonunda, bu maddelerin çevre dokulara geçmesine engel olunmasında büyük bir rol üstlenmektedirler. Bireylerin beslenme alışkanlıkları kanser oluşumu üzerinde önemli rol oynamaktadır. Bireyin beslenmesinde bulunan fermente ürünlerin hemen hemen hepsi probiyotik bir/birkaç suş içermektedir ve bu suşlar kanser oluşumuna neden olabilen patojenleri ve maddeleri inhibe ederek mikrobiyota ve insan sağlığı açısından pozitif bir etki sergilemektedir (Ayebo, Angelo & Shahani, 1980).

Kanser çeşitlerinden probiyotiklerle olan ilişkisi en çok çalışılan tür kolon kanserleridir. Probiyotikler, bulunduğu canlının bağışıklığını arttırması, prekanserojenlerin inhibe edilmesi, bakterisidal maddelerin üretimi gibi pek çok olumlu etki sergilemektedir (Rafter, 2002).

2.4.6. Obezite

Yağ ve enerji oranı yüksek beslenme alışkanlığının, mikrobiyotayı değiştirerek adipoz doku artışına sebep olduğu gözlenmiştir. İntestinal flora bakterilerindeki farklılaşma ile kilo artışı ve metabolik sendrom ilişkisinin araştırıldığı pek çok çalışma mevcuttur. Çok sayıda yapılan hayvan deneylerinde metabolik enerji dengesi ve vücut yağlanması üzerinde intestinal mikrobiyotanın çok önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir (Esteve, Ricart & Real, 2011).

Obez bireylerle yapılan araştırmalarda, bireylerin intestinal bakteri çeşitliliğinin azaldığı, patojen bakterilerin arttığı gözlemlenmiştir (Angelakis, Armaugom, Million & Raoult, 2012). Obez adölesanlarla yapılan araştırmalarda erişkinlere paralel bir biçimde

mikrobiyal değişimler saptanmıştır (Bervoets vd., 2013; Karlsson, 2012). Kilo kaybı sayesinde mikrobiyota ilk haline dönmektedir (Santacruz vd., 2009; Nadal vd., 2009).

Obezite üzerinde en etkili olan tür *Bifidobacterium*'dur. Bu probiyotik türde meydana gelen azalma bireylerin mikrobiyotasında istenmeyen bir durumdur ve tedavi için öncelikle takviye edilmesi gereken bakteri grubunun *Bifidobacterium* olduğu vurgulanmaktadır (Cani vd., 2007).

2.5. *Lactobacillus rhamnosus*

L. rhamnosus Gram pozitif, basil şeklinde bir bakteri olup, insanlarda bağırsak mikrobiyotasının doğal bir elemanıdır. Fonksiyonel ve takviye edici gıdalara sıklıkla eklenmekte ve güvenilir olduğu kabul edilmektedir. *L. rhamnosus*'un bağışıklık sistemini dengelediği, alerjileri ve dermatiti hafifletebildiği gözlemlenmiştir. *L. rhamnosus* kadınlarda yağ kütlesini azaltarak, ağırlık kaybını kolaylaştırmıştır (Sanchez vd., 2014). 2016 yılında farelerle yapılan bir çalışmada *L. rhamnosus*'un, ağırlığı önemli ölçüde düşürdüğü bulunmuştur (Ivanovic vd., 2016). Yapılan başka bir çalışmada *L. rhamnosus'*un obeziteyle mücadele ettiğini, anti-obezite ve anti-enflamatuar özellikler gösterdiği bildirilmiştir (Pothuraju, Sharma, Chagalamarri, Kavadi & Jangra, 2015). *L. rhamnosus* karaciğerlerinde işlev bozukluğu olan obez çocuklarda olumlu karaciğer parametreleri geliştirmiştir (Vajro vd., 2011). Yüksek yağ oranına sahip bir beslenme düzeninde *L. rhamnosus* kullanımının, metabolizmada meydana gelen indüklenmiş yağlanmaya karşı koruyucu özellik gösterdiği ve farelerde insülin direncini yok ettiği belirtilmiştir (Park, Kim & Hyun, 2015a). Ayrıca *L. rhamnosus*'un diyabet açısından faydalı olduğu, farelerle yapılan çalışmada bakterinin anti-hiperglisemik ve anti-diyabetik etki uyguladığı, glukoz toleransını ve insülin duyarlılığını arttırdığı gözlemlenmiştir (Park vd., 2015b). Ayrıca gastrointestinal sistem enfeksiyonları ve ishalin önlenmesi amacıyla tercih edilen probiyotiklerin başında *L. rhamnosus* bulunmaktadır. Özellikle çocuklarda, ishal süresini azalttığı, gün başına düşen gastrointestinal enfeksiyonların görülme sıklığını azalttığı gösterilmiştir (Segers

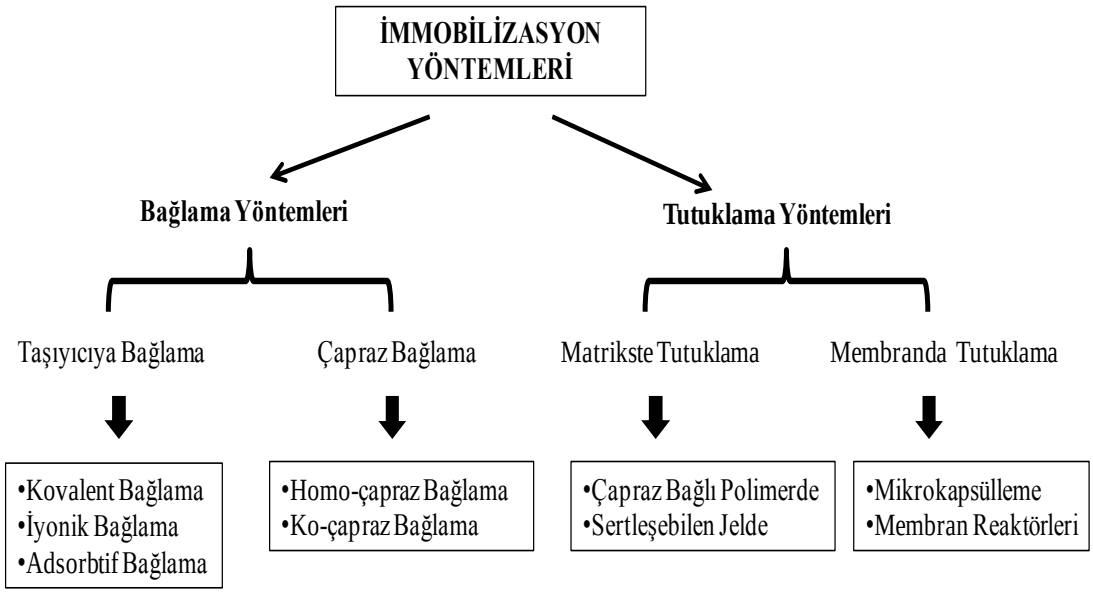
& Lebeer, 2014). Szajewska ve Kolodziej tarafından 2015 yılında yapılan bir araştırmada, *L. rhamnosus'* un uzun süreli antibiyotik kullanımından kaynaklanan diyare oluşumunu yarı yarıya azalttığı rapor edilmiştir (Szajewska & Kołodziej, 2015). Dişlerde çürük meydana gelmesine neden olan *Streptococcus mutans*'ın ağız mikrobiyotasındaki varlığı *L. rhamnosus* kullanan bireylerde azalmıştır (Segers & Lebeer, 2014).Yine probiyotik bakteri *L. rhamnosus* kullanılmasının inflamatuar sitokin yapımını baskıladığı ve bu sayade atopik dermatit oluşumunu engellediği fareler ile yapılan çalışmada belirtilmiştir (Kim vd., 2012).

2.6. Bakteri İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon; suda çözünen ve çözeltide serbest halde bulunabilen moleküllerin, suda çözünmeyen reaksiyona girmeye eğilimli polimerik destek materyaller aracılığıyla hareketlerinin kısıtlandırılması olarak tanımlanır (Demirel, 2003). İmmobilizasyon işlemi uygulanmış enzimler ile enzimin hareketleri kısıtlandırılıp, belirli bir destek veya polimerik matrikste ele geçirilerek defalarca katalitik aktivite sergilemesi hedeflenir. Bahsedilen bu işlem yalnızca enzimlere değil buna ek olarak hücresel organellere, bitki hücrelerine, hayvan hücrelerine, mikrobiyal hücrelere v.b. uygulanabilmektedir (Telefoncu, 1999). Chibata ve çalışma grubu, 1969 yılında immobilize enzim uygulamalarını endüstride ilk kez kullanıma sunmuşlardır. Hücrelerin immobilizasyon çalışmaları ile ilgili ilk uygulamalar yine Chibata ve arkadaşları tarafından, 1973 yılında *E.coli*'nin poliakrilamit jellerde enkapsüle edilmesi ile gerçekleştirilmiştir (Demirel, 2003). Gıda mahsullerinin üretimini zorlaştıran ve maliyetini artıran bazı spesifik prosesler, probiyotik bakterilerin immobilizasyonunu (tutuklanması) zorunlu kılmaktadır (Burgain, Gaiani, Linder & Scher, 2011). Bakteri hücrelerinin tutuklanması göz önünde tutulduğunda, probiyotik bakteri suşu seçimi, iyi yönde sağlık etkileri için gereken miktar, prosesler yahut depolanma esnasında probiyotik canlıların stabilitesi ve gıdanın duyusal (tat, doku vb.) özellikleri üzerindeki etkileri dikkatle ele alınmalıdır (Burgain vd., 2011).

2.7. İmmobilizasyon Yöntemleri

Kelime anlamı itibariyle immobilizasyon, maddelerin hareketini sınırlandırma olarak ifade edilmektedir. İmmobilize edilmiş enzimlerin hareketleri gerçek anlamda sınırlandırılmış olmaktadır. Tutuklanmış enzim kalıp bir isim olmakla birlikte 'immobilize', 'çözünmez hale getirilmiş', 'bağlanmış' gibi terimlerle eş anlamlıdır. İmmobilizasyon teknikleri en yaygın olarak enzim molekülleri için kullanılmakta endüstride uygulama alanı da bulmaktadır. Aynı yöntemler bazı küçük modifikasyonlar ile bakteri hücresi tutuklamada da kullanılmaktadırlar. Pek çok farklı immobilizasyon yötemi rutin olarak kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan temel immobilizasyon yöntemleri Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Temel İmmobilizasyon Yöntemleri (Lehninger, Nelson & Cox, 1993; Scragg, 1988).

2.8. Mikroenkapsülasyon

Kapsülleme, herhangi bir maddeyi başka bir maddeye tutuklayan, nanometre (nano kapsülleme), mikrometre (mikro kapsülleme) veya milimetre ölçeklerinde parçacıklar üretilen bir işlem olarak tanımlanmaktadır (Burgain vd., 2011). Kapsüle edilmiş maddeye genel itibariyle aktif madde, dolgu maddesi, çekirdek malzeme, iç faz veya yük taşıma fazı denir. Kapsüle etmek amacıyla kullanılan maddelere kaplama zarı, taşıyıcı, kabuk ya da duvar malzemesi, dış faz veya matris denilmektedir. Dondurularak kurutma gibi spesifik kapsülleme işlemlerinde kapsüle etmek amacıyla kullanılan maddelere kriyoprotektanlar da denilmektedir. Gıda endüstrisinde ürünlerde veya işlemlerde kullanılmak istenen duvar malzemesi gıda türevi olmalı, ayrıca etken madde ile çevresi arasında bariyer oluşturabilmelidir (Manojlovic, Nedovic, Kailasapathy & Zuidam, 2010).

Laktik asit bakterilerinin kapsüllenmesi, sindirim sistemi kanalındaki canlılıklarını sürdürebilmek ve metabolik dengelerini korumak, ayrıca gıdalarda depolama süresince canlılıklarını koruyabilmek amacıyla efektif bir teknoloji olarak öne sürülmüştür (Manojlovic vd., 2010). Bu anlamda canlılık, konak sağlığı açısından faydalı bir etki oluşturmak üzere hayatta kalabilen sıkışmış (kapsüllenmiş) probiyotik hücrelerin sayısı olarak tanımlanmaktadır (Krasaekoopt, Bhandari & Deeth, 2003). Enkapsülasyon, püskürtme ve kurutma yoluyla *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 başta olmak üzere birçok laktik asit bakterisinin depolanması sırasında hücre canlılığını arttırmak için başarıyla kullanılmıştır (Desmond, Ross, Callaghan, Fitzgerald & Stanton, 2002).

Probiyotik bakteriler, vücuda alındıkları zamandan bağırsakta kolonize olana kadar canlı kalmalıdırlar. Bu durum oldukça zor bir süreçtir, çünkü probiyotik bakteriler sindirim sistemindeki kuvvetli asidik ortamı ve safrayı atlatmalıdırlar. Probiyotik bakterilerin mikroenkapsüle edilmeleri, tüm bu olumsuzluklara maruz kalan canlı hücrelere koruma sağlayan güvenli bir yoldur (Burgain vd., 2011). Bunların yanında

gıda endüstrisinde mikroenkapsülasyon ile işleme ve paketleme şartlarına direnç gösterme, aroma, stabilite, besin değeri, lezzet ve ürün görünümünü iyileştirme gibi faydalar sağlandığı bildirilmiştir (Cock & Castillo, 2013).

2.9. Taşıyıcı Seçimi

İmmobilizasyon amacıyla kullanılan teniklerde doğada doğal olarak bulunan saf veya yapay, çeşitli organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Taşıyıcılar membran, suda çözünmeyen katı veya polimerik yapılardan oluşabilmektedir. Hapsetme yönteminde kullanılan taşıyıcılarda veya destek materyallerinde belli başlı özelliklerin olması gerekir. Bu özellikler; hidrofilik bir karakter sergileme, suda çözünmeme, gözenekli (porlu) yapıya sahip olma, mekanik etkilere dayanıklı olma ve uygun parçacık formuna sahip olma, kimyasal maddelere ve/veya yüksek sıcaklıklara karşı stabil olma, ucuzluk, mikroorganizmalara karşı dirençli ve zehirsiz olma, yenilenebilir olma olarak sayılabilir (Demirel, 2003; Telefoncu, 1999).

Bilhassa hücreleri immobilize etmek amacıyla tercih edilen polimerlerde aranacak ekstra bazı kriterlerler bulunmaktadır. Jel oluşumunu sağlayacak polimer çözeltisi ve hücre süspansiyonu kolayca karıştırılabilmelidir. Hücrelerin yaşamlarını sürdürebilmeleri amacıyla, zehir içeren maddelerin olmadığı ılımlı bir bölgede jel elde edilmelidir. Jel, fermentasyon koşulları içerisinde mekanik stabilitesini koruyabilmeli ve toksik maddeler içermemelidir. Maliyetin totali düşük olmalıdır. Jel por çapları, istenilen maddenin kapsül içine girişine ve oluşan ürünlerin kapsül dışına çıkışına izin vermeli, hücrelerin kapsül dışına çıkmasına izin vermemelidir (Margaritis & Merchant, 1984).

2.9.1. Alginat

Alginat, doğal polimerik yapılı özellikle enzim ve probiyotik bakteri enkapsülasyonunda başarılı ve yaygın olarak kullanılan bir materyaldir. Biyolojik uyumluluğu, kolay polimerleşmesi, ekonomik olması gibi pek çok elverişli özelliğinden dolayı biyomühendislik ve biyomedikal alanda yaygın kullanım alanına sahiptir. Jelleşme şartlarına müdahale edilebilmektedir (Lee & Mooney, 2012).

Alginat, β-D manuronik asit (M) ve α-L-guluronik asitlerin (G) glikozidik bağ (1→4) ile bağlanması ile oluşan ve kahverengi alglerden elde edilen polisakkarit yapılı bir moleküldür. Aljinik asitin sodyum tuzu olan sodyum alginat, enzim ve bakteri immobilizasyonunda kullanılmaktadır. Alginatın etkili olan fonksiyonel özellikleri, algdeki M ve G oranlarına göre değişmektedir (Klaenhammer & Kullen, 1999; Cock & Castillo, 2013).

2.9.2. Pektin

Pektin, alginat gibi kapsül oluşturan ve toksik olmayan bir polimerdir. Pektin ucuz ve kolay elde edilebilen bitki kökenli bir bileşiktir. Bazı literatür verileri, pektinin bakteriyel hücreler için alginattan daha iyi koruma sağladığını göstermektedir, bu da çevrede bulunan maddelerle kimyasal etkileşimlere karşı daha az hassas olmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, diğer araştırmalar meyvelerdeki pektinin aynı zamanda etkili bir prebiyotik olarak kullanılabileceğini ve dolayısıyla insan sağlığını olumlu yönde etkileyebileceğini göstermektedir (Jasińska vd., 2018).

Pektin, galakturonik asit bakiyelerinin karboksil gruplarının düşük metil esterifikasyon derecesi ile karakterizedir. Kalsiyum iyonları varlığında hidrojeller oluşturur. Oluşan bu hidrojeller, çeşitli ilaçların inflamasyon bölgelerine taşınmasında

kullanılır. Pektin düşük konsatrasyonlarda kullanıldığında da yapısındaki protein ve asetil gruplarından dolayı stabil bir yapı sergilemektedir (Açu, Yerlikaya & Kınık, 2014).

Pektin doğal bir bitki polimeri olup, protein ve peptitlerin taşınmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Pektinler, midenin asidik şartlarından etkilenmezler ve ince bağırsakta yer alan enzimlerin yardımı ile parçalanırlar (Chelpanova & Efimtseva, 2016).

2.9.3. Karragenan

Karragenan, yenilebilir kırmızı deniz yosunlarından elde edilen doğal bir karbonhidrattır (polisakkarit). *Chondrus crispus* isimli deniz yosunu türünden elde edilir. Kuzey Amerika ve Avrupa kıyıları boyunca üretilir ve bu bölgelerde evlerde öksürük ve soğuk algınlığı tedavisi için kullanılır. Karragenan türleri özellikle, gıdalarda jelleşme, kıvam arttırıcı ve dengeleyici olarak ticari uygulamalarda kullanılır. Bunlara ek olarak karragenan soslarda, kozmetik ürünlerde ve endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak tercih edilmektedir. Fermente süt ürünlerinde de ürünün asiditesinin azaltılması, ürünlere ilave edilen immobilize edilmiş bakteriler veya enzimler sayesinde yapılmaktadır. (Necas & Bartosikova, 2013).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Probiyotik Bakteri

Bu tez kapsamında deneysel çalışmalarda probiyotik bakteri suşu olarak *Lactobacillus rhamnosus* LGG kullanıldı. Bakteri suşu Chr. Hansen firmasından liyofilize formda, 24 g'lık orijinal paketli hali ile temin edildi.

3.1.2. Bakteri İmmobilizasyonunda Kullanılan Kaplama Materyalleri

Probiyotik *L. rhamnosus* bakterisinin immobilizasyonu için doğal polimerlerden sodyum alginat, pektin ve kappa-karragenan kullanıldı. Mikrokapsüllerin oluşmasında sertleştirici ajan olarak, $CaCl_2$ ve KCl çözeltilerinden yararlanıldı.

3.1.3. Kullanılan Besiyerleri, Dilüsyon Sıvıları ve Çözeltiler

Çalışma sırasında liyofilize bakteri suşlarının aktif hale getirilmesinde ve mikrobiyolojik bakteri sayımlarında MRS (*Lactobacillus* Agar acc. to DE MAN, ROGOSA and SHARPE) Broth (Merck) ve MRS Agar (Merck) besiyerleri aseptik koşullarda hazırlanarak kullanıldı.

Mikrobiyolojik analizler için homojenizasyon ve dilüsyon çözeltilerinin hazırlanmasında TPS (Tamponlanmış Peptonlu Su - Merck) kullanıldı.

3.1.4. Kullanılan Cihaz ve Kimyasal Maddeler

Probiyotik bakteri immobilizasyonun hedeflendiği bu çalışmada, Trakya Üniversitesi, Arda Meslek Yüksekokulu, Mikrobiyoloji Laboratuvarında yer alan ve aşağıda belirtilen cihaz ve ekipmanlar kullanıldı.

- Otoklav (Nüve OT 90L)
- Ekim kabini (Nüve MN 120)
- Destile su cihazı (Nüve NS 104)
- Sterilizatör (Pastör fırını) (Nüve FN 120)
- İnkübatör (Nüve EN 120)
- Çalkalamalı İnkübatör (Biosan ES-20/60)
- Analitik terazi (Presica XR305A)
- pH metre (Hanna HI 221)
- Homojenizatör (Heidolph SilentCrusher M)
- Stomacher (İnterscience-BagMixer)
- Manyetik karıştırıcı (Dragon Lab MS-H-)

- Vorteks (Heidolph Reax top)
- Dağıtıcı ve mikropipetler (Eppendorf)

Sarf malzeme olarak, steril petri, erlen mayer, beher glass, balon joje, deney tüpleri, mezür, steril pipetler, drigalski özeleri kullanıldı.

Çalışmada yer alan kimyasal maddeler istenilen analitik saflıkta olup, Fluka, Merck, Aldrich, Sigma firmalarından ticari olarak temin edildi.

3.2. Metot

3.2.1. Liyofilize Bakterilerin Aktive Edilmesi (Canlandırma)

Liyofilize haldeki *L. rhamnosus* bakterilerinin aktive edilip, canlandırılması için 100 mL'lik erlen mayerlerde hazırlanmış MRS Broth besiyerlerine ekimleri yapılıp, 37 ^{o}C' de aerobik koşullarda 48 saat süreyle inkübasyonları gerçekleştirildi. Daha sonra bu besiyerlerinden aynı koşullarda hazırlanan MRS broth besiyerlerine 2. kez pasaj yapılarak yine aynı koşullarda inkübasyona bırakıldılar. İmmobilizasyon çalışmaları yapılacak olan bu stok kültürdeki *L. rhamnosus* final konsantrasyonu 10^8 - 10^9 CFU/mL olacak şekilde ayarlandı.

3.2.2. Probiyotik Bakteri İmmobilizasyon Çalışmaları (Uygun Desteğin Seçimi)

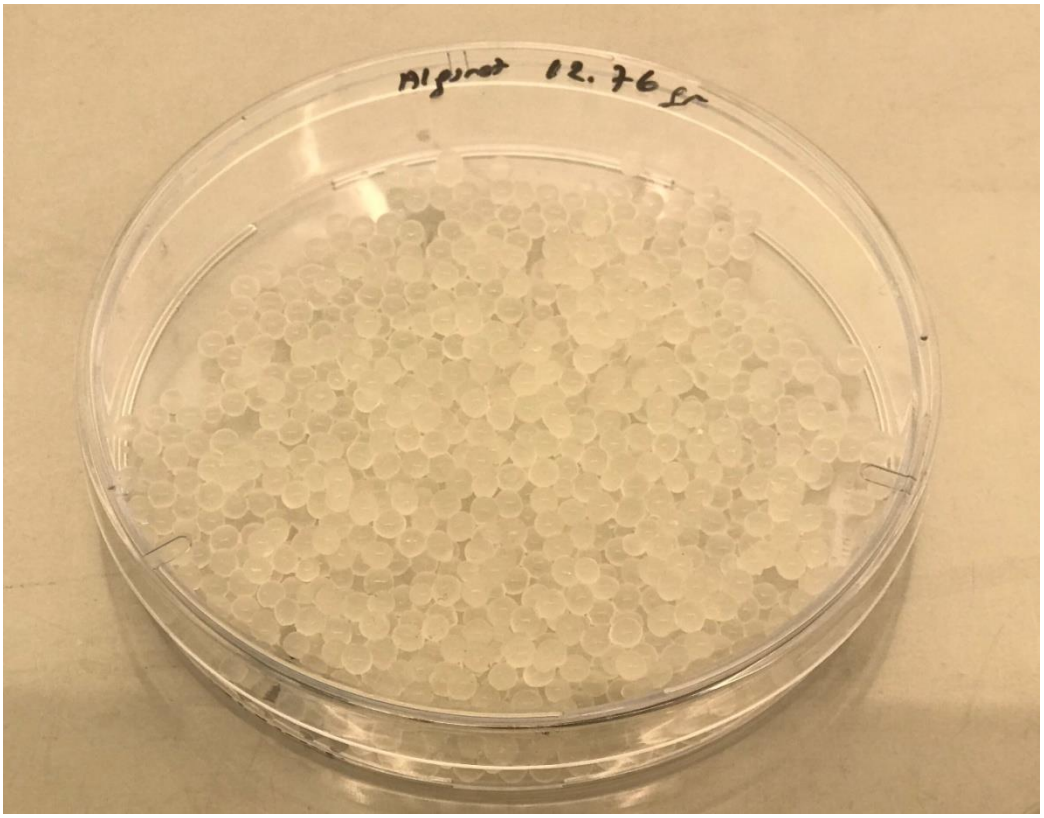
Çalışmanın bu bölümünde, probiyotik bakteri olduğu bilinen ve Chr. Hansen firmasından temin edilen *Lactobacillus rhamnosus*'un immobilizasyonu için doğal olan

farklı destek maddelerinin immobilizasyona uygunluğu araştırıldı. Bu amaçla sodyum alginat, pektin ve kappa karagenan olmak üzere üç farklı destek maddesi kullanıldı.

3.2.2.1. Probiyotik Bakterinin Alginat Boncuklar İçinde Tutuklanması

ı

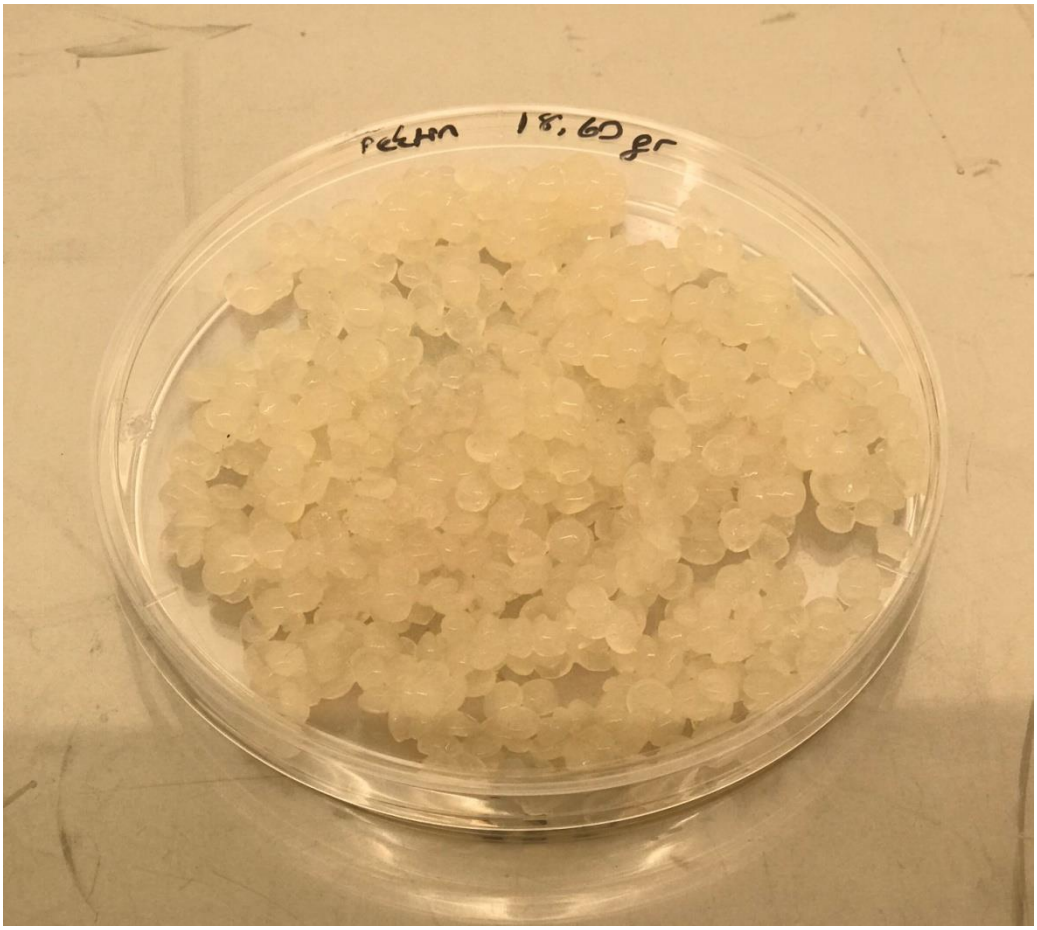
L.rhamnosus'un alginat ile immobilizasyonunda, ekstrüzyon tekniği aşağıda belirtildiği gibi modifiye edilerek kalsiyum alginat boncukları elde edildi. (Krasaekoopt vd., 2003; Jantarathin vd., 2017). Bu yöntemi gerçekleştirmek için, MRS broth içinde üretilen ve mL'sinde $2.26x10^8$ adet bakteri içeren stok kültür kullanıldı. Bu stok kültürün 5 mL'si, son hacim % 2.0 oranında sodyum alginat içerecek olan 15 mL steril alginat çözeltisine eklendi. Bakteri ve alginat karışımı, manyetik karıştırıcı ile 10 dakika süreyle yavaşça karıştırılarak homojen dağılmaları sağlandı. Elde edilen karışım yani bakteri alginat süspansiyonu, steril yeşil uçlu 21 G enjektör yardımı ile, 100 mL %3 $CaCl_2$ çözeltisine aradaki uzaklık 30 cm olacak şekilde damlatıldı. Bu sayede probiyotik bakteri içeren kalsiyum alginat boncukları oluşturuldu (Karthikeyan, Elango, Kumaresan, Gopalakrishnamurty & Raghunath, 2014). Oluşan boncuklar 30 dakika daha manyetik karıştırıcıda tamamen katılaşması için karıştırıldı ve bu sürenin sonunda 1 saat +4°C'de buzdolabında bekletildi. Daha sonra boncuklar süzülüp steril disitle su ile yıkandı ve Whatman No 4 filtre kağıdından süzülerek kullanıma hazır hale getirildi. Elde edilen boncuklar Şekil 3.1'de gösterildi.



Şekil 3.1. Alginat kapsüller

3.2.2.2. Probiyotik Bakterinin Pektin İçinde Tutuklanması

Probiyotik bakterinin doğal bir polisakkarit olan citrus pektini ile immobilizasyonu için %5 (w/v) olacak şekilde pektin çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözelti otoklavda steril edildi. Daha sonra, MRS broth içinde üretilmiş ve $2.26x10^8$ CFU/mL bakteri içeren bakteri süspansisyonunun 5 mL'si 15 mL pektin çözeltisi ile karıştırıldı. Bu karışım steril bir enjektör (21G, yeşil uç) ile yavaşça karıştırılan % 5 $CaCl_2$ (w/v) çözeltisine (100 mL) damlatıldı. Oluşan boncuklar kararlılıklarını sağlamaları için +4°C'de 1 saat bekletildi. Ardından boncuklar steril distile su ile yıkanarak kullanıma hazır hale getirildi (Khorasani & Shjaosadati, 2017). Elde edilen boncuklar Şekil 3.2'de gösterildi.



Şekil 3.2. Pektin kapsüller

3.2.2.3. Probiyotik Bakterinin Kappa-karragenan İçinde Tutuklanması

Kappa-karragenandan % 1.0 ve % 2.0 (w/v) lik çözeltiler hazırlandı. MRS broth'da üretilmiş *L. rhamnosus* bakteri süspansiyonundan 5'er mL alınarak hem %1.0 hem de % 2.0 lik karışımları hazırlandı. Bu karışımlar steril enjektör (21G yeşil uç) yardımı ile yavaşça karışmakta olan 0.3 M KCl çözeltisine damlatıldı. Diğer yöntemlere benzer şekilde 1 saat +4°C'de buzdolabında bekletildi. Daha sonra süzülüp steril distile su ile yıkandı (Baysal & Karagöz, 2005).

3.2.3. Canlı Probiyotik Bakteri Sayısının Belirlenmesi

İmmobilize ve serbest bakteri hücrelerinin miktarını belirlemek amacı ile canlı hücre sayılarının belirlenebildiği yayma plak yöntemi kullanıldı. Mikrokapsüller içinde olan bakteri hücrelerinin farklı yöntemler kullanılarak serbest hale gelmeleri sağlandı. Hem serbest hem de boncuk dışına çıkmış hücre süspansiyonları seri dilüsyon tekniği ile sulandırıldı, MRS agar plaklarına yayma yöntemi ile ekimleri gerçekleştirildi ve 48 saat süreyle inkübe edildi. Serbest bakterilerin bulunduğu stok kültür solüsyonunun 1.0 mL'sindeki bakteri sayısı belirlendikten sonra, bu stoktan kullanılan 5 mL bakteri ile hazırlanan boncukların 1.0 g'ında olması beklenen bakteri sayıları (*Xb*) oranlanarak hesaplandı. 1g boncukların patlatılması ile elde edilen çözeltiden ekim yapılan tüm MRS plaklarında oluşan koloniler sayılarak 1.0 g boncukta tutuklanmış olan canlı probiyotik bakteri sayıları (*Xt*) da hesaplandı. Tüm hesaplamalar log CFU/mL ve log CFU/g olarak yapıldı ve gerekli dönüştürmeler sağlandı (Jantarathin vd., 2017; Wu & Zhang, 2018).

Tüm yöntemler için % İmmobilizasyon Etkinliği;

İE (%) = *Xt* / *Xb* x 100 formülüne göre hesaplandı.

Xt: 1.0 g boncukta tutuklandığı gözlenen probiyotik bakteri sayısı

Xb: 1.0 g boncukta tutuklanması beklenen probiyotik bakteri sayısı

3.2.4 İmmobilize Bakterilerin Kapsül Dışına Çıkması İçin Yöntem Seçimi

Farklı araştırıcılar tarafından yapılmış probiyotik bakteri immobilizasyon çalışmaları incelendiğinde kapsül içindeki bakteri hücrelerini dışarı çıkarmak için değişik yöntemlerin kullanıldığı gözlemlendi. Çalışma için en uygun boncuk patlatma yöntemini belirlemek için stomacher (BagMixer), ultrasonik homojenizatör (Heidolph

SilentCrusher M), vortex (Heidolph Reax top), çakalamalı inkübatör cihazları (Biosan ES20/60) kullanıldı.

3.2.4.1. Stomacher İle Boncuk Dışına Çıkarma

İmmobilize bakterinin kapsül dışına çıkışını sağlamak için 1.0 g boncuk tartıldı, 99.0 mL pH'ı 7.0 olan 0.2 M fosfat tamponuna alındı. Tampon içine aktarılmış boncuklar, stomacher aletinde 20 dakika aralıklı olarak homojenize edildi. Bu cihazın mekanik etkisi sayesinde boncukların parçalanması ve enkapsüle olmuş bakteri hücrelerinin tampon çözelti içinde serbest hale geçmesi sağlandı. Serbest hale geçen bakterilerin sayısı bölüm 3.2.3'de belirtildiği gibi saptandı (Sedefoğlu, 2014).

3.2.4.2. Ultrasonik Homojenizatör ile Boncuk Dışına Çıkarma

Tutuklanmış probiyotik bakteri sayısının belirlenmesi amacıyla boncuk (mikrokapsül) parçalama yöntemi olarak homojenizatörden faydalanıldı. Yine 1.0 g boncuk 99.0 mL fosfat tamponuna (pH 7.0, 0.2 M) aktarılarak bu karışım 27.000 rpm/dk'de 10 saniye süreyle homojenize edildi. Bu sürenin sonunda boncukların tamamen parçalanıp homojen bir görünüm oluşturduğu gözlendi. Tampon içindeki serbest bakteri sayısı log CFU/g olarak hesaplandı. (Wu & Zhang, 2018; Haffner & Pasc, 2018).

3.2.4.3. Çalkamalı İnkübatör (Klipsli Çalkalayıcı) İle Boncuk Dışına Çıkarma

Enkapsülasyon işlemi uygulanmış probiyotik bakterilerin kapsül (boncuk) dışına salınmasını sağlayan yöntemlerden biri de klipsli bir çalkalayıcıda belirli aralıklarla tampona alınmış boncukları çalkalamaktır (Klaenhammer, 2001; Huq vd., 2017). Çalışmanın bu bölümünde, yine 1.0 g boncuk tartılıp, pH'ı 7.0 olan 99.0 mL fosfat tamponuna eklenip, 30 dakika 250 rpm'de klipsli çalkalayıcıda oda sıcaklığında çalkalandı. Diğer yöntemlerde olduğu gibi açığa çıkan bakteri sayısı MRS agarda canlı hücre sayım tekniği ile saptandı (Ansari & Pourjafar, 2017).

3.2.4.4. Vortex İle Boncuk Dışına Çıkarma

İmmobilize probiyotik bakteri *L.rhamnosus*'un vortex yardımı ile boncuklardan çıkarılması için tartılan 1.0 g boncuk 99.0 mL 0.2 M pH 7.0 fosfat tamponu içine alınarak 20 dakika boyunca belirli aralıklarla vortexle karıştırıldı. Vortexin mekanik etkisi ile immobilize bakterilerin boncuk dışına çıkması sağlandı (Chamdramouli, Kailasapathy, Peiris & Jones, 2004). Açığa çıkan bakteri sayısı bölüm 3.2.3'deki gibi hesaplandı.

3.2.5. Alginat İmmobilizasyonunun Optimizasyon Çalışmaları

Çalışmamızda *Lactobacillius rhamnosus* bakterisinin immobilizasyonu için alginat immobilizasyonunda etkili olan alginat konsantrasyonu, $CaCl_2$ %'si, yüklenen bakteri sayısı gibi parametrelerin immobilize bakteri sayısına etkisi araştırıldı.

3.2.5.1. En Uygun Alginat Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Bölüm 3.2.2.1'de anlatılan alginat immobilizasyonu alginat çözeltisinin %1.0-4.0 olacak şekilde dört farklı konsantrasyonu hazırlandı. Her bir alginat çözeltisine aynı miktarlarda bakteri solüsyonu eklendi ve ekstrüzyon tekniği ile immobilize edildi. Dört farklı konsantrasyonda alginat içeren (%1, %2, %3 ve %4) boncuklar en etkin boncuk patlatma yöntemi olan ultrasonik homojenizatörle parçalanarak boncuk içindeki hücreler açığa çıkarıldı ve her konsantrasyon için bakteri sayıları hesaplandı.

3.2.5.2. En Uygun $CaCl_2$ Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Alginat immobilizasyon yönteminde önemli parametrelerden biri de $CaCl_2$ miktarıdır. Alginat jellerin oluşumunu sağlar. Bu nedenle yapılan bu çalışmada boncuk oluşturmada kullanılan $CaCl_2$'ün dört farklı çözeltisi hazırlandı (%1-%4). Her bir çözeltiye alginat ve bakteri sayısı sabit tutularak dört çeşit boncuk oluşturuldu. Her bir boncuk grubunun içerdiği bakteri sayısı daha önce belirtildiği gibi hesaplandı.

3.2.5.3. En Uygun Yüklenen Bakteri Sayısının Belirlenmesi

Alginat-bakteri süspansiyonun hazırlanmasında, alginat miktarı sabit tutularak (% 2 w/v) karışımdaki bakteri yüzdesinin farklı oranlarda olması sağlandı. Karışımdaki bakteri yüzdesi % 15, %20, %25, %30 ve % 35 olacak şekilde beş farklı alginat boncuk oluşturuldu. Bütün boncuk gruplarının içerdiği immobilize canlı bakteri sayısı MRS agar kullanılarak hesaplandı.

3.2.6. Ortam pH'nın Serbest ve İmmobilize Canlı Probiyotik Bakteri Sayısına Etkisi

Serbest ve immobilize *L.rhamnosus* bakteri hücrelerinin, içinde bulundukları ortam pH'larından nasıl etkilendiklerini araştırmak için farklı pH değerlerine sahip tampon çözeltiler hazırlandı. pH 4.0 ile 5.0 için 0.2 M'lık asetat tamponları, pH 6.0 ve 7.0 için ise 0.2M'lık fosfat tamponu hazırlandı. İmmolize bakteriler için 1'er g boncuk; serbest bakteriler için 1 mL bakteri süspansiyonu 9.0 mL farklı pH'lardaki tampon çözeltilere aktarıldı. Hazırlanan tüm örnekler buzdolabında +4°C'de 4 saat bekletildi. Bu bekleme süresinin sonunda örneklerdeki hücre sayıları saptandı. İmmobilize ve serbest bakteri sayıları farklı pH değerlerine bağlı olarak karşılaştırıldı.

3.2.7. Simüle Edilmiş (Yapay) Mide Özsuyu ve Safra Tuzunun Serbest ve İmmobilize Canlı Probiyotik Bakteri Sayısına Etkisi

Simüle edilmiş (yapay) mide suyu ve safra tuzunun (Oxbile-Merck) alginat ile immobilize edilmiş ve serbest probiyotik *L.rhamnosus* üzerine etkisinin araştırıldığı bu bölümde pepsinsiz yapay mide suyu ve safra tuzu hazırlandı. Simüle mide suyu; %7.0 HCl (v/v) içerisinde %2.0 (w/v) NaCl olacak şekilde hazırlandı. Safra tuzu ise 100 mmol/L NaOH içinde 2.0 g/L safra tuzu (Oxbile-Merck) ve pH 6.8 olarak hazırlandı. 1.0 gram boncuk 10 mL yapay mide suyu; 1 gram boncuk 10 mL safra tuzu ile bir araya getirildi ve 37 °C'de 4 saat süreyle bekletildi. Bu sürenin sonunda daha önce belirtildiği şekilde hücre sayımları gerçekleştirildi. Aynı deney sistemi serbest bakteriler için de gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar başlangıçtaki canlı hücre sayısı ile karşılaştırıldı (Fijalkowski, Peitler, Rakoczy & Zynwicka, 2016; Wu & Zhang, 2018).

Bu tez çalışması kapsamında yer alan deneysel çalışmalar aseptik şartlar altında ve üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.2.8. İstatistiksel Analizler

Tüm deneyler üç paralel tekrar olacak şekilde çalışıldı. Sonuçlar aritmetik ortalama ± standart sapma şeklinde belirtildi. Hata çubukları grafiklerin üzerinde gösterildi. İkili karşılaştırmalar için Independent Student T Test, çoklu karşılaştırmalar için One- way ANOVA-Tukey-HSD, testleri kullanıldı. Bu tez çalışmasının istatistiksel analizleri SPSS 20.0.0. programı ile çalışıldı.

BÖLÜM 4

BULGULAR

4.1.İmmobilizasyon İçin Uygun Destek Maddesinin Belirlenmesi

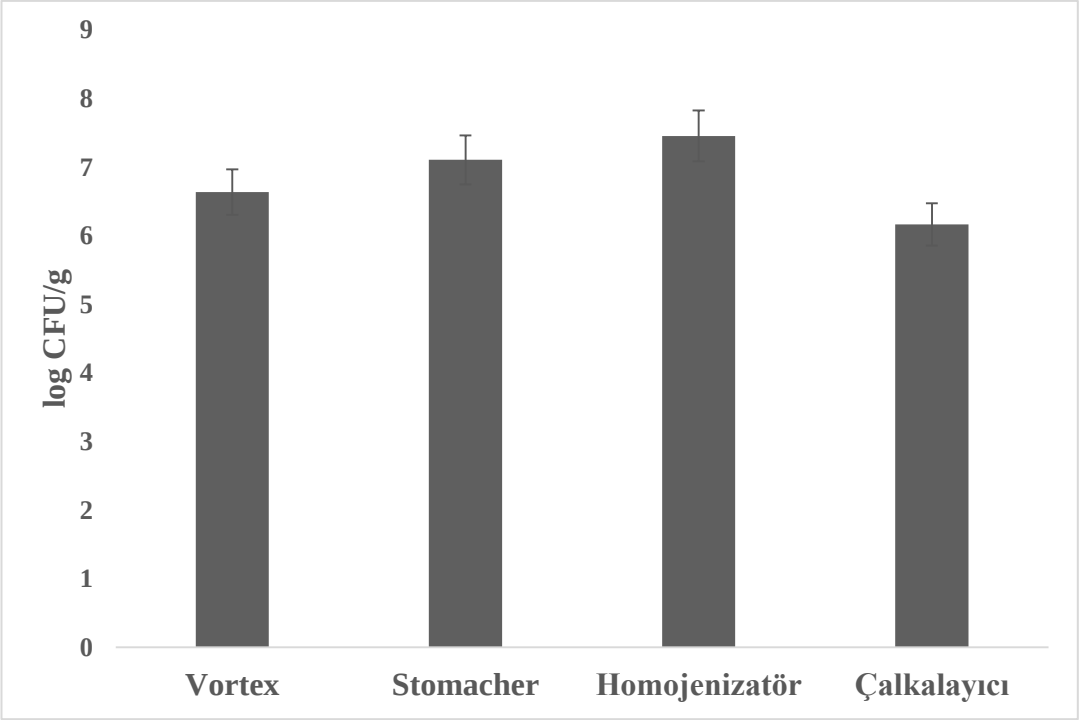
Günümüzde gıda endüstrisinde probiyotik bakteri olarak kullanılan *Lactobacillus rhamnosus*'un immobilize edilmesinin amaçlandığı bu çalışmada öncelikle farklı destek maddeleri immobilizasyon için kullanıldı. İmmobilizasyon destek materyali olarak doğal kaynaklı pektin, alginat ve k-karragenan ile bölüm 3.2.2. ve alt başlıklarında belirtildiği gibi bakteri immobilizasyonu gerçekleştirildi. Alginat ve pektin ile düzgün küresel boncuklar oluşurken k-karregenan ile amorf yapılar oluştu. Bu nedenle k-karregenanda hücre sayımı yapılmadı. Pektin ve alginat boncuklarda immobilize olan bakteri sayıları hesaplandı (Çizelge 4.1.). İmmobilizasyon etkinliği değerlendirildiğinde %89.76'lık etkinlik ile alginatın daha uygun bir materyal olduğuna karar verildi. Bundan sonraki deneylere alginat ile devam edildi.

Çizelge 4.1. Alginat ve Pektin İçin Bakteri İmmobilizasyon Etkinliği

Destek Materyali	1 g boncukta beklenen bakteri sayısı (logCFU/mL) Xb	1 g boncukta gözlenen bakteri sayısı (logCFU/mL) Xt	İE(%)
Alginat	7.91±0,074	7.10±0,035	89.76
Pektin	7.75±0,064	6.88±0,085	88.77

4.2. İmmobilize Bakterilerin Kapsül Dışına Çıkması İçin Yöntem Seçimi

Alginat boncuklara immobilize edilen probiyotik bakteri *L. rhamnosus*'un kapsül içindeki sayılarını belirlemek için tekrar dışarı çıkarmak gerekmektedir. Bu amaçla farklı çalışmalarda çeşitli yöntemlerle boncuk içeriği dışarı çıkarılmıştır. Bu tez çalışmasında da stomacher, ultrasonik homojenizatör, vortex, klipsli karıştırıcının yer aldığı dört farklı yöntem kullanıldı. Bakterilerin boncuk dışına çıkmasında en etkili yöntemin 7.46 log CFU/g koloni sayısı ile ultrasonik homojenizatör kullanımı olduğu belirlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. İmmobilize Bakterilerin Kapsül Dışına Çıkması İçin Yöntem Seçimi

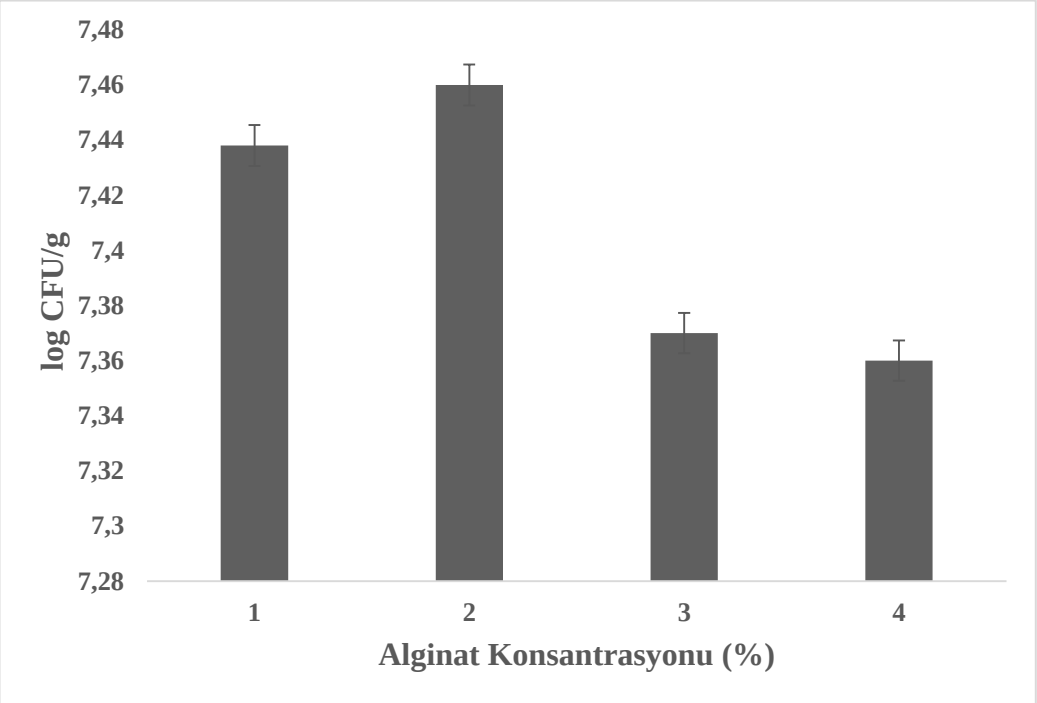
4.3. Alginat İmmobilizasyonunun Optimizasyon Çalışmaları

Çalışmanın bu aşamasında alginat ile bakteri immobilizasyonunda etkili olduğu bilinen bazı parametreler araştırıldı. Böylece immobilizasyon şartları optimize edilmeye çalışıldı. Bu parametreler ve etkileri başlıklar halinde açıklandı.

4.3.1. En Uygun Alginat Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Alginat konsantrasyonunun bakteri immmobilizasyonuna olan etkisini araştırmak amacıyla immobilizasyon işlemi alginatın 4 farklı konsantrasyonunda gerçekleştirildi. Böylece dört grup boncuk oluşmuş oldu. Bu boncukların içerdiği bakteri sayıları hesaplandığında en düşük bakteri sayısı 7.36 log CFU/g olarak %4

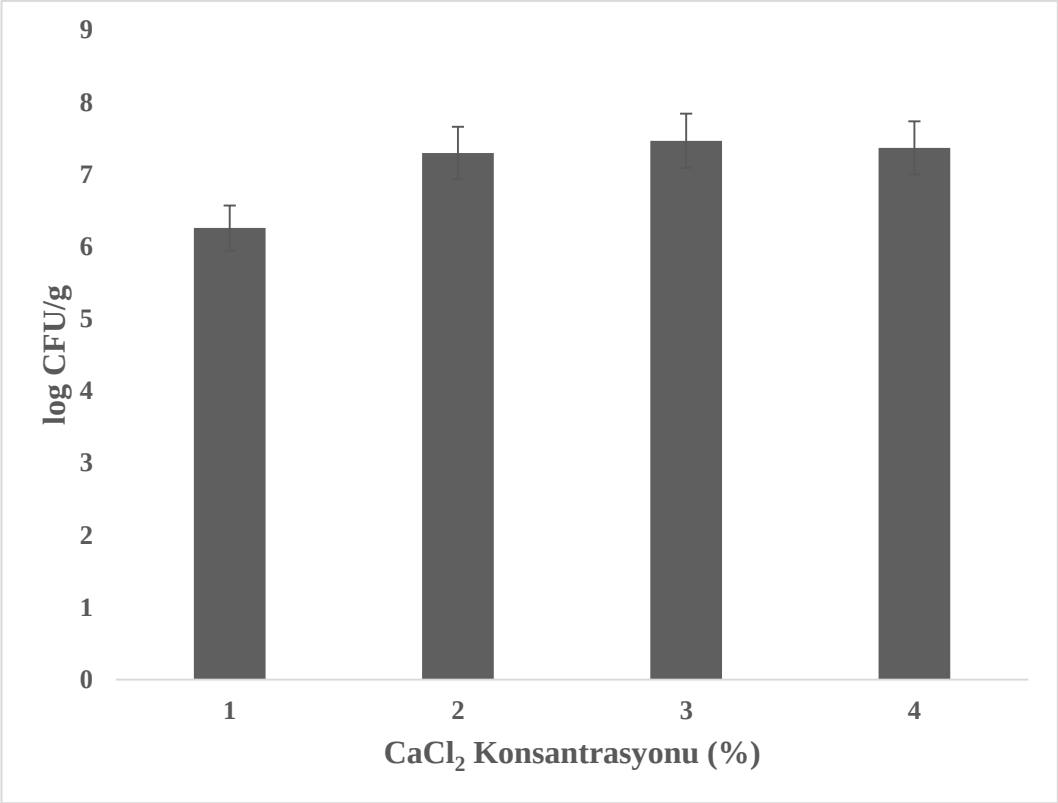
alginat içeren boncuklarda saptandı. En yüksek bakteri sayısı ise 7.46 log CFU/g ile %2'lik alginat içeren örneklerde hesaplandı (Şekil 4.2).



Şekil.4.2. Alginat Konsantrasyonun İmmobilizasyona Etkisi

4.3.2. En Uygun $CaCl_2$ Konsantrasyonunun Belirlenmesi

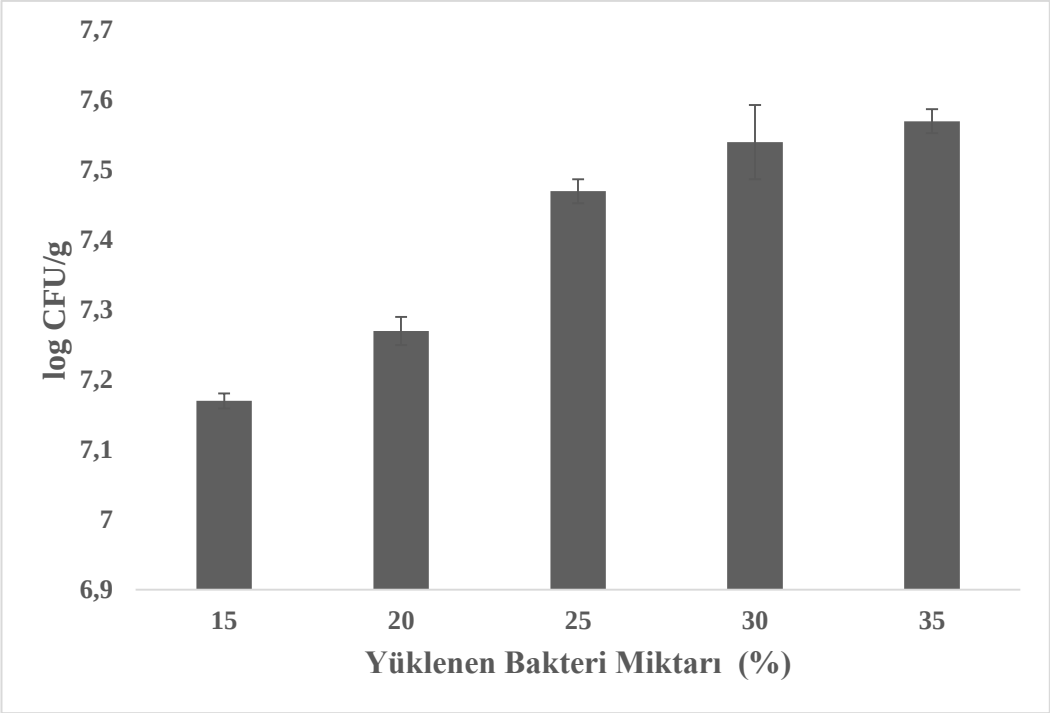
Alginat küreciklerin oluşumunda Ca-alginatın oluşmasını sağlayan $CaCl_2$ miktarının immobilizasyona olan etkisi şüphesiz çok büyüktür. Bu etkinin *L. rhamnosus* immobilizasyonunu nasıl etkilediğini belirlemek için dört farklı $CaCl_2$ çözeltisinde oluşturulan boncukların 1.0 g'ındaki bakteri sayıları belirlendi. Şekil 4.3'de de görüldüğü gibi, en yüksek bakteri sayısı %3 $CaCl_2$ içeren örnekte 7.47 log CFU/g olarak; en düşük sayı ise %1 $CaCl_2$ örneğinde 6.26 log CFU/g ve aralarındaki farkın anlamlı olduğu ($p<0.05$) saptandı.



Şekil.4.3. $CaCl_2$ Konsantrasyonun İmmobilizasyona Etkisi

4.3.3. En Uygun Yüklenen Bakteri Sayısının Belirlenmesi

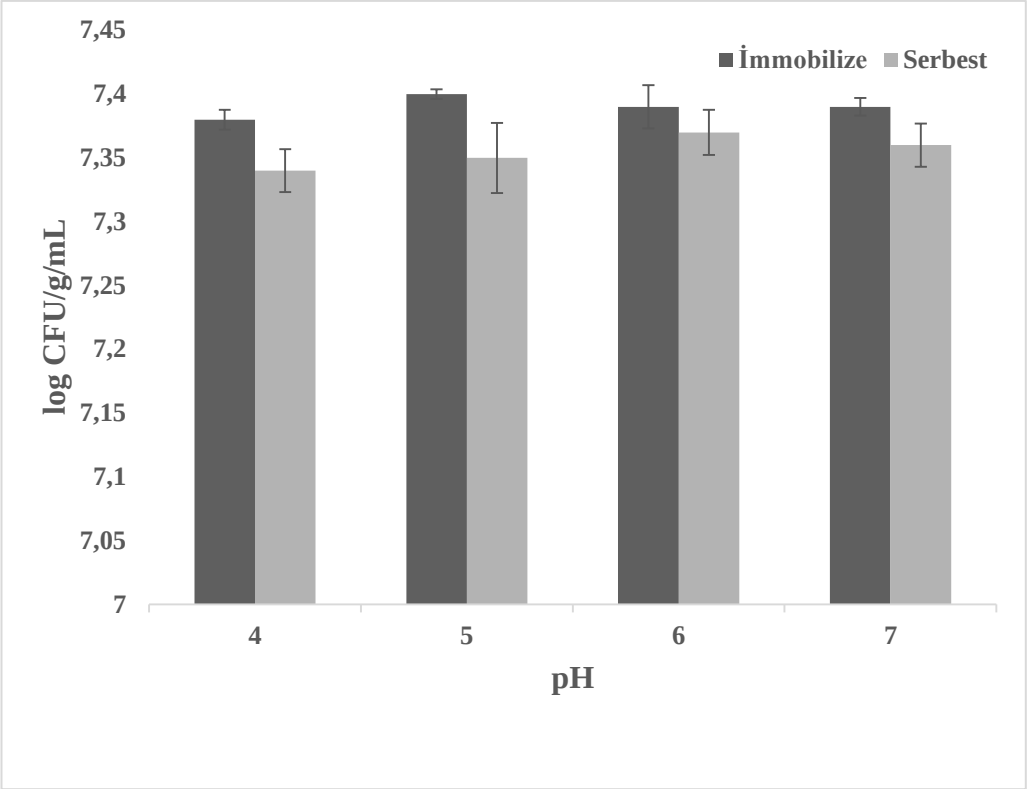
L. rhamnosus'un alginat boncuklara immobilize edilmesinde başlangıçtaki bakteri sayısının immobilizasyona etkisi araştırıldı. Bölüm 3.2.5.3' de açıklandığı gibi farklı sayıda bakteri yüklenmiş boncuklardan immobilizasyon sonrası açığa çıkan bakteri sayıları hesaplandığında en yüksek değerin, sağlıklı olarak yüklenebilen en yüksek doz olan %35 lik örneğe ait olduğu gözlendi (Şekil 4.4). Bu değerin %15 ve %20' lik değerlere göre anlamlı olduğu ($p<0.05$) belirlendi.



Şekil.4.4. Yüklenen Bakteri Sayısının İmmobilizasyona Etkisi

4.4. Ortam pH'nın Serbest ve İmmobilize Canlı Probiyotik Bakteri Sayısına Etkisi

Ortam pH'sının probiyotik bakterilere etkisini araştırmak için farklı pH'larda 4 saat süreyle bekletilmiş serbest ve immobilize bakteri sayıları hesaplanarak hem kendi içlerinde hem de birbirleriyle karşılaştırıldı. pH 4.0 – 7.0 aralığında belirlenen immobilize ve serbest bakteri sayılarının birbirine çok yakın olduğu ve kendi grupları arasındaki farkın anlamlı olmadığı ($p>0.05$) gözlendi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Ortam pH'nın Serbest ve İmmobilize Canlı Probiyotik Bakteri Sayısına Etkisi

4.5. Simüle Edilmiş (Yapay) Mide Suyu ve Safra Tuzunun Serbest ve İmmobilize Canlı Probiyotik Bakteri Sayısına Etkisi

L. rhamnosus üzerine yapay mide suyu ve safra tuzunun etkisini araştırmak amacıyla, hem immobilize hem serbest bakteri hücreleri 37 °C'de 4 saat süreyle bu ajanlar ile muamele edildi. Bu işlemin ardından canlılığını koruyabilen bakteri hücreleri daha önce belirtildiği gibi sayıldı. Başlangıçtaki canlı hücreler ile karşılaştırıldı. Serbest bakteri hücrelerinin hem simüle mide suyu hem de safra tuzu ile muamele sonrası canlılıklarını tamamen yitirdikleri gözlendi. İmmobilize bakterilerin ise yapay mide suyunda yaklaşık % 68, safra tuzunda da % 58 canlılığını koruduğu belirlendi (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Yapay Mide Suyu ve Safra Tuzu ile Muamele Edilmiş Bakterilerin Yaşayabilirlikleri (%)

	Serbest Bakteri Hayatta Kalma Yüzdesi (%)	İmmobilize Bakteri Sayısı (log CFU/g)	İmmobilize Bakteri Hayatta Kalma Yüzdesi (%)
Yapay Mide Suyu	-	5.0±0,068	68.39
Safra Tuzu	-	4.3±0,083	58.82

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Son yıllarda özellikle obeziteyle birlikte artış gösteren sağlık problemleri, beslenme bilincinin de artması ile tüketilen gıdaların tekrar gözden geçirilmesine neden olmuştur. Gıda maddelerinde lezzetli olma özelliğinin aranmasının yanı sıra, fonksiyonel gıdalarda olduğu gibi insan sağlığı için terapötik ve koruyucu olma özelliklerine olan ilgi de her geçen gün artmaktadır. Fonksiyonel gıda ürünlerinden biri de probiyotiklerdir (Altun & Özcan, 2013; Farias vd., 2019).

Probiyotikler bulundukları konakçıya yarar sağlayan canlı mikroorganizmalardır. Faydaları arasında bağırsak mikrobiyotasını düzenlemek, patojen bakteri üremesini engellemek, immün sistemi uyarmak, kabızlığı engellemek, vitamin sentezini ve kalsiyum emilimini arttırmak, obezite ve diyabete karşı savaşmak sayılabilir (Kanmani vd., 2011; Mandrachia vd., 2018).

Probiyotik mikroorganizmalar, gıda endüstrisinde çeşitli gıda maddelerine eklenerek, yararlı etkilerinden faydalanmak için kullanılmaktadırlar. Ancak bu yararlı etkileri için fonksiyonel gıda olarak kullanıldıklarında, Uluslararası Gıda Federasyonu tarafından en az gıdaki miktarı 10^7 olmalıdır diye kabul edilmiştir. Ayrıca bağırsağa

ulaşıp kolonize olması için mide asidi, safra gibi ajanlara dirençli olmalıdır (Shi vd., 2013).

Probiyotik bakteri içeren fonksiyonel gıdaların sindirim sisteminden zarar görmeden geçmeleri için bakterilerin immobilizasyonları (enkapsülasyon) gündemdedir. Bu amaçla en sık kullanılan *Lactobacillus*'lar *ve Bifidobacterium*'lardır. Alginat ve kitosan en yaygın ve etkili kullanılan bakteri tutuklama polimerleridir. Doğal, nontoksijenik ve ucuz olmaları tercih sebeplerindendir (Kanmani vd., 2011; Prasanna & Charalampopoulos, 2019).

Bu tez çalışmasında, probiyotik bir bakteri olduğu bilinen *Lactobacillus rhamnosus*'un alginat boncuklara (mikrokapsüllere) immobilizasyonu amaçlandı. Bu sayede bakterinin sindirim sistemindeki şartlardan etkilenmeden kanalı geçmesi hedeflendi. Chr. Hansen firmasından elde edilen liyofilize *L.rhamnosus* bakteri hücreleri öncelikle aktive edildi ve MRS broth besiyerinde üremeleri sağlandı. Daha sonra aktive edilen probiyotik bakteri hücreleri pektin, alginat ve k-karragenan kullanılarak immobilize edildiler. Alginat ve pektin için immobilizasyon sonuçları Çizelge 4.1' de verildi. İmmobilizasyon verimi en iyi alginat kapsüllerde bulunduğu için deneylere alginat ile devam edildi.

Kapsül içinde tutuklanan bakteri hücrelerinin miktarını tespit edebilmek için alginat boncuklardan dışarı çıkarmak gerekliydi. Daha önce yapılan çalışmalarda farklı yöntemlerin kullanıldığı gözlendi. Bu yöntemler stomacher (Sedefoğlu, 2014.), ultrasonik homojenizatör (Wu & Zhang, 2018; Haffner & Pasc, 2018), vortex (Chamdramouli vd., 2004) ve klipsli çalkalayıcı (Klaenhammer, 2001; Huq vd., 2017) cihazları kullanılmak sureti ile uygulanmıştı. Bu amaçla, literatürde yer alan dört farklı yöntem aynı bakteri hücreleri için denendi ve bu yöntemleri bir arada değerlendirme imkanı bulundu. Şekil 4.1'de de görüldüğü gibi mevcut çalışma koşullarında en etkili yöntem ultrasonik homojenizatör cihazı ile gerçekleştirilen serbestleştirme işlemi olarak belirlendi. Bu yöntemde boncuk yapılarının tamamen bozulduğu etkin bir dışarı salınımın olduğu saptandı.

Alginat ile bakteri immobilizasyonun optimizasyon çalışmalarında hem yüksek verim hem de standardizasyon sağlamak amacıyla, alginat konsantrasyonu, $CaCl_2$ %'si, yüklenen bakteri sayısı gibi parametreler çalışıldı. Bu grup çalışmaların sonuçları Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te gösterildi. İmmobilizasyon, alginat konsantrasyonu açısından değerlendirildiğinde %2'lik alginat çözeltisi ile yapılan immobilizasyonun 7.46 log CFU/g değeri ile daha başarılı olduğu gözlendi (Şekil 4.2) Çalışmamızın bulgularına benzer olarak daha önceki çalışmalarda da alginat %2 (Trabelsi vd., 2013; Atia vd., 2017) ve %3 (Jantarathin vd., 2017) olarak kullanılmıştır.

Ekstrüzyon tekniğinde alginat-bakteri karışımının içine damlatıldığı çözelti olan $CaCl_2$ miktarının etkisi araştırıldığında en iyi sonuç 7.47 log CFU/g bakteri sayısı ile %3'lük çözeltide edlde edildi (Şekil 4.3). Bu çalışmaya benzer olarak probiyotik bakteri *Streptococcus phocae* P180 ile yapılan enkapsülasyon deneylerinde de aynı konsantrasyonda çözelti ile çalışılmıştır (Kanmani vd., 2011). *Lactobacillus plantarum*'un alginat-arabioxylan karışımı ile immobilizasyonunda ise %1.0'lik $CaCl_2$ çözeltisi kullanılmıştır (Wu & Zang, 2018).

Yüklenen bakteri sayısının etkisi araştırıldığında Şekil 4.4'te görüldüğü gibi, başlangıçta yüklenen bakteri sayısı arttıkça boncuk içindeki bakteri sayısının da arttığı saptandı. Ancak %25, %30 ve %35 bakteri içeren örneklerdeki artışın anlamlı bir artış olmadığı gözlendi. Bu nedenle ekonomik açıdan da %25 bakteri içeren ortamın kullanılması tercih edildi.

L. rhamnosus'un alginat ile enkapsülasyon çalışmaları; %2.0 alginat, %3.0 $CaCl_2$, %25 bakteri içeriği olarak optimize edildi.

Ortam pH' ının probiyotik bakteriye etkisinin araştırıldığı çalışmalarda asetat ve fosfat tampon sistemleri kullanıldı. Serbest ve immobilize *L. rhamnosus*' un direkt tampon içinde 4 saat süreyle bekletildiğinde bakteri sayılarının anlamlı bir değişiklik göstermediği gözlendi (Şekil 4.5) Nispeten ılımlı pH'larda bakterilerin 4 saatlik

beklemeden etkilenmemesi bu değerlere yakın pH'lardaki gıdalar için her iki formunun da kullanılabileceğini gösterir durumdadır. Ancak süre uzaması ve tabi ki gastrointestinal sistemi geçiş durumları için yeterli veri oluşturmamaktadır. Bu nedenle yapay mide suyu ve safra tuzu simülasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Daha önce *Lactobacillus plantarum* TN8 ile yapılan bir çalışmada pH 3.0 ve 8.0'de 4 saat inkübe edilen çalışma sonuçları pH 6.0 değerini desteklemektedir. Bu bakteri de pH 8.0'da 4 saat bekleme sonucunda serbest ve immobilize hücrelerin sayısında önemli değişiklik olmadığı rapor edilmiştir (Trabelsi vd., 2013).

Mide suyu ve safra tuzu similasyon çalışmalarında, hem serbest hem de immobilize edilmiş bakteri hücreleri, hazırlanışları bölüm 3.2.7'de belirtilen mide suyu ve safra tuzu çözeltileri içersinde 37 °C'de 4 saat süreyle bekletildiler ve bu sürenin sonunda hayatta kalan bakteri hücreleri sayıldı. Hayatta kalma yüzdeleri hesaplandı (Tablo 4.2). Sonuçlar incelendiğinde serbest bakteri hücrelerinin hem yapay mide suyu hem de safra tuzu ile 4 saat bekleme sonunda canlılıklarını tamamen yitirdikleri saptandı. İmmobilize bakteri hücrelerinin ise yapay mide suyunda yaklaşık %68; safra tuzunda da %58 oranında canlılığını koruduğu gözlendi. İmmobilize ve serbest *Bifidobacterium animalis* ile yapılan simülasyon çalışmalarında mide suyu %2 NaCl ve 0.08M HCl ile hazırlanmıştır. Serbest bakterilerin 90 dakika sonunda hepsinin öldüğü, alginat ile immobilize olanların ise yaklaşık %85'nin canlılığını koruduğu rapor edilmiştir (Prasanna & Charalampopoulos, 2019). *Bifidobacterium longum* alginat ve kollajen enkapsülayon çalışmasında mide suyu pepsin, tuz, HCl ile hazırlanmış ve 120 dakika inkübasyon sonunda serbest bakterilerin hepsinin öldüğü immobilize bakterilerin de %50'sinin hayatta kaldığı belirtilmiştir (Su vd., 2011). Bir diğer çalışmada alginat ve kitosan ile beraber enkapsüle edilen *Lactobacillus rhamnosus* ve *Lactobacillus casei* hücreleri NaCl, pepsin ve HCL ile hazırlanan mide suyu ile muamele edilmiştir. Her ikisinin de tüm hücre formlarında önemli bir azalma olduğu 240 dakika sonunda *L.casei* immobilize hücrelerin %57.8 oranında hayatta kaldıkları belirlenmiştir (Farias vd., 2019). *Lactobacillus plantarum*'un alginat-arabinoxylan immobilizasyon deneyinde pepsinli mide suyu ve 100 mmol/L NaOH içinde 2g/L safra tuzu olacak şekilde hazırlanan safra tuzu çözeltileri kullanılmıştır. Safra tuzu ile 2 saat inkübasyon sonucunda serbest hücrelerin tamamının öldüğü, immobilize olanların ise %47.65 nin

hayatta kaldığı bildirilmiştir (Wu & Zhang, 2018) Yine Laktobasillerden *L.bulgaricus*'un alginat-süt küreciklerine immobilize edildiği başka bir çalışmada 1 saat bekleme sonunda tüm serbest bakterilerin yaşamını tamamen yitirdikleri bulunmuştur (Shi vd., 2013). Yapılan tüm simülasyon çalışmalarında görülmektedir ki in vitro denemelerde probiyotik bakteri immobilizasyonu mide suyu ve safra tuzuna karşı bakterilerin hayatta kalma oranlarını oldukça önemli oranda arttırmaktadır. Bu çalışmaların bulguları da bu sonuçları destekler niteliktedir.

Sonuç olarak en uygun destek materyali olarak alginat seçildi ve optimizasyon çalışmaları alginatla yapıldı. Optimizasyon çalışmalarında en uygun parametreler %2 alginat, %3 $CaCl_2$ ve %25 oranında yüklenen bakteri seçildi. Mikroorganizmaların boncuk dışına çıkarılmasında en etkili yöntemin ultrasonik homojenizatör olduğu belirlendi. Ayrıca her iki bakteri formunun da pH, mide suyu ve safra tuzuna olan direnci bu çalışmada araştırıldı. Serbest bakterilerin yapay mide suyu ve safra tuzunda tamamının öldüğü, immobilize bakterilerin %68.39 yapay mide suyunda ve %58.82 safra tuzunda canlı kalabildiği gözlemlendi. Elde edilen bulgular bizim ve diğer araştırıcıların bundan sonraki probiyotik-prebiyotik kombinasyonları ve koimmobilizasyon çalışmalarına ışık tutar niteliktedir.

KAYNAKLAR

Açu, M., Yerlikaya, O. & Kınık, Ö. (2014). Mikroenkapsülasyon ve süt teknolojisindeki yeri. *Akademik Gıda, 12*(1), 97-107.

Altun, B., & Özcan, T. (2013). Süt ürünlerinde probiyotik bakterilerin mikroenkapsülasyou II: Kaplama materyalleri ve süt ürünlerinde uygulamaları. *Uluudağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 27*(2), 105-114.

Angelakis, E., Armaugom, F., Million, M., & Raoult D. (2012). The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. *Future Microbiology, 7,* 91-109.

Ansari, F., & Pourjafar, H. (2017). Characteristics of beads from Lactobacillus acidophilus probiotic microencapsulation with calcium alginate and resistant starch, *The IIOAB Journal, 8*(5): 47-52.

Argin, S. (2007). *Microencapsulation of probiotic bacteria in xanthan-chitosan polyelectrolyte complex gels.* 70 p. PhD. Dissertation, University of Maryland, College Park, USA

Atia, A., Gomma, A. I., Fliss, I., Beyssac, E., Garrait G., & Subirade, M. (2017). Molecular and biopharmacetical investigation of alginate-inulin synbiotic coencapsulation of probiotic to targer the colon. *Journal of Microencapsulation, 34(*2), 171-184.

Ayebo, A. D., Angelo, I. A., & Shahani, K. M. (1980). Effect of ingesting *Lactobacillus acidophilus* milk upon fecal flora and enzyme activity in humans. *Milch Wissenschaft, 35*, 730-733.

Baysal, S. H., & Karagöz, R. (2005). Preparaion and characterization of k-carrageenan immobilized urease. *Preparative Biochemistry & Biotec*hnology, *35,* 135-143.

Bervoets, L., Van Hoorenbeeck, K., Kortleven, I., Van Noten, C., Hens, N., Vael, C. Goossens, H., Desager, K. N., & Vankerckhoven, V. (2013). Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: a cross-sectional study. *Gut Pathology, 5,* 1-10.

Bajaj, B. K., Claes, I. J. .J, & Lebeer, S. (2015). Functional mechanısms of probiotics. *Journal of Microbiology and Biotechnology Food Science, 4*(4), 321-327.4

Bowen, W. H., & De Paola, D. P. (2000). *Dairy Foods and Oral Health (Chapter 7) in "Handbook of Dairy Foods and Nutrition",* Editors: G.D. Miller, J.K. Jarvis & L.D. McBean, Second Edition, National Dairy Council, Rosemont, Illinois, CRC Pres LLC, U.S.A.

Brady, L. J., Gallaher, D. D., & Busta, F. F. (2000). The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. *Journal of Nutrition, 130,* 10-414.

Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering, 104(4),* 467-483.

Cani, P. D, Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Tuohy, K. M., Chabo, C., Waget, A., Delmée, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrières, J., Tanti, J.F., Gibson, G.R., Casteilla, .L,

Delzenne, N. M., Alessi, M. C., & Burcelin, R. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes, 56,* 1761–1772.

Castagliuolo, L. M., Riegler, M. F., Valenick, I., La Mont, J. T., & Pathoulakis, C. (1999). Saccharomyces boulardii; protease inhibits the effects of Clostridium difficile toxins A and B in human colonic mucosa. *Infection and Immunity, 67,* 302-307.

Chamdramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., & Jones, M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect Lactobacillus spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods, 56,* 27-35.

Champagne, C., & Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, *18*(2), 184-190.

Chelpanova, T. I., & Efimstseva, E. A. (2016). Alkaline phosphatase immobilization on spherical pectin gel particles. *Applied Biochemistry and Microbiology, 52,* 44-52.

Cock, L. S., & Castillo, V. V. (2013). Probiotic encapsulation. *African Journal of Microbiology Research, 7*(40), 4743-4753.

Coşkun, T. (2006). Pro-, pre- ve sinbiyotikler. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi, 49,* 128-148.

Çakır, S., Midilli, M., Erol, H., Şimşek, N., Çınar, M., Altıntas, A., Alp, H., Altıntas, L., Cengiz, Ö., & Antalyalı, A. (2008). Use of combined probiotic-prebiotic, organic acid and avilamycin in diets of Japanese quails. *Revue de Médecine Vétérinaire, 159,* 565-569.

Çetinkaya, M., & Köksal, N. (2004). Nekrotizan Enterokolit. *Güncel Pediatri, 2,* 146-151.

Demirci, M., Sağdıç, O., Çavuş, M., Pehlivanoğlu, H., Çağlar, M.Y., & Yılmaz, M. T. Prebiyotik oligosakkaritlerin kaynakları, üretimleri ve gıda uygulamaları. *European Journal of Science and Technology, 6*(10), 20-31.

Demirel, G., (2003). *Tutuklanmış Aspergillus niger kullanılarak sitrik asit üretimi ve sitrik asit üretimi üzerine çeşitli etkilerin incelenmesi*. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

Desmond, C., Ross, R. P., O'Callaghan, E., Fitzgerald, G., & Stanton, C. (2002). Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. *Journal of Applied Microbiology, 93,* 1003–1011.

Dinleyici, E.C., Eren, M., Ozen, M., Yargic, Z.A., & Vandenplas, Y. (2012). Effectiveness and safety of *Saccharomyces boulardii* for acute infectious diarrhea. *Expert Opinion on Biological Therapy*, *12*(4), 395-410.

Douglas, L. C., & Sanders, M. E. (2008). Probiotics and prebiotics in dietetics practice. *Journal of the American Dietetic Association, 108,* 510-521.

Erdeve, Ö., Tıraş, Ü., Çamurdan, O., Tanyer, G., & Dallar, Y. (2002). Çocuk yaş gruplarında antibiyotiğe bağlı ishallerde *Saccharomyces boulardii*'nin profilaktik etkisi. *Turkiye Klinikleri Journal of Pediatrics, 11*(3), 121-125.

Erdoğan, Z., Erdoğan, S., Aslantaş, Ö., & Çelik, S. (2010). Effects of dietary supplementation of synbiotics and phytobiotics on performance, caecal coliform population and some oxidant/antioxidant parameters of broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 94*(5), 40-48.

Eroğlu, C. (2008). Akut İshalli Hastaya Yaklaşım. Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlara Pratik Yaklaşımlar Sempozyumu. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul.

Esteve, E., Ricart, W., & Real, J. M. F. (2011). Gut microbiota interactions with obesity, insulin resistance and type 2 diabetes: did gut microbiote co-evolve with insulin resistance?. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 14,* 483-490.

Evren, M., Albayram, C., & Apan, M. 2006). Laktik asit bakterilerinin oluşturduğu antimikrobiyel maddeler. Türkiye 9. Gıda Kongresi; 24-26 Mayıs, Bolu.

Farias, T. G. S., Ladislau, H. F. L., Stamford, T. C. M., Medeiros, J. A. C., Soares, B. L. M., Arnaud, T. M. S., & Stamford T. L. M. (2019). Viabilities of *Lactobacillus rhamnosus* ASCC 290 and *Lactobacillus casei* ATCC334 (in free form or encapsulated with calcium alginate-chitosan in yellow mombin ice cream. *LWT-Food Science and Technology, 100,* 391-396.

Fijalkowski, K., Peitler, D., Rakoczy, R., & Zynwicka, A. (2016). Survival of probiotic lactic acid bacteria immobilized in different forms of bacterial cellulose in simulated gastric juices and bile salt solution. *LWT-Food Science and Technology, 68,* 322-328.

Fijan, S. (2014). Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health, 11*(5), 4745-4767.

Guandalini, S., Pensabene, L., Zikri, M. A., Dias, J. A., Casali, L. G., Hoekstra, H., Kolacek, S., Massar, K., MeceticTurk, D., Papadopoulou, A., DeSousa, J. S., Sandhu, B., Szajewska, H., & Weizman, Z. (2000). *Lactobacillus* GG administered inoral rehydration solution to children with acute diarrhoea:a multicenter European trial. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 30*(1), 54-60.

Guslandi, M., Giollo, P., & Testoni, P. A. (2003). A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology, 15*(6), 697-698.

Gülmez, M., & Güven, A. (2002). Probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotikler. *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 8,* 83- 89.

Gürsoy, O., Kınık, Ö., & Gönen, İ. (2005). Probiyotikler ve gastrointestinal sağlığa etkileri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 35,* 136-148.

Grand, R.J., & Watkins, J.B. (1976). Development of the human gastrointestinal tract. A review. *Gastroenterology, 70,* 790-810.

Guo, S., Liu, D., Zhang, B., Li, Z., Li, Y., Ding, B., & Guo, Y. (2017). Two *Lactobacillus* species inhibit the growth and α-toxin production of *Clostridium perfringens* and induced proinflammatory factors in chicken intestinal epithelial cells *in vitro. Frontiers in Microbiology,* doi: 10.3389/fmicb.2017.02081

Haffner, F. B., & Pasc, A. (2018). Freeze-dried alginate-slica microparticles as carries of probiotic bacteria in apple juice and beer. *LWT-Food Science and Technology, 91,* 175-179.

Heczko, P. B., Strus, M. & Kochan, P. (2006). Critical evaluation of probiotic activity and lactic acid bacteria and their effects. *Journal* of *Physiology. Pharmacology, 57*(Suppl 9), 5-12.

Hennequin, C., & Kaufmann-Lacroix, C. (2002). Possible role of catheters in Saccharomyces boulardi fungemia. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases,19,* 16-20.

Hoseinifar, S. H., Ringø, E., Shenavar Masouleh, A., & Esteban, M. Á. (2014). Probiotic, prebiotic and synbiotic supplements in sturgeon aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture, 8*(1), 89–102.

Hotten, P., Marotta, F., Naito, Y., Minelli, E., Helmy, A., Lighthouse, J., Fuji, H., & Fesce, E. (2003). Effects of probiotics, lactitol and rifaximin on intestinal flora and fecal excretion of organic acids in cirrhotic patients. *Chinese Journal of Digestive Diseases, 4*(1), 13-18.

Hsieh, C. W., Lu, W. C., Hsieh, W. C., Huang, Y. P., Lai, C. H. & Ko, W. C. (2009). Improvement of the stability of nattokinase using g-polyglutamic acid as a coating material for microencapsulation. *LWT Food Sciences & Technology, 42*, 144-149.

Huq, T., Fraschini, C., Khan, A., Riedid, B., Bouchard, J., & Lacroix, M. (2017). Alginate based nano composite for microencapsulation of probiotic: Effect of cellulose nanocrystal (CNC) and lecithin. *Carbohydrate Polymers,168,* 61-69.

Ivanovic, N., Minic, R., Djuricic, I., Radojevic Skodric, S., Zivkovic, I., Sobajic, S., & Djordjevic, B. (2016). Active *Lactobacillus rhamnosus* LA68 or *Lactobacillus plantarum* WCFS1 administration positively influences liver fatty acid composition in mice on a HFD regime. *Food & Funcion, 7(6),* 2840-2848.

İnanç, N., Şahin, H., & Çiçek, B. (2005). Probiyotik ve prebiyotiklerin sağlık üzerine etkileri. *Erciyes Tıp Dergisi, 27,* 122-127.

Jasińska, U. T., Skąpska, S, Owczarek, L., Dekowska, A., & Lewińska, D. (2018). Immobilization of *Bifidobacterium infantis* cells in selected hydrogels as a method of increasing their survival in fermented milkless beverages. *Journal of Food Quality*, Article ID 9267038, 1-11.

Jantarathin,S., Borompichaichartkul, C., & Sanguandeekul, R.(2017). Microencapsulation of probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules and its

effect on viability under heat process in shrimp feeding. *Materials Today: Proceedings, 4,* 6166–6172.

Johansson, I. (2002). Milk and dairy products: possible effects on dental health. *Scandinavian Journal of Nutrition, 46*(3), 119-122.

Kanmani, P., Kumar, R. S , Yuvaraj, N., Paari, K. A, Pattukumar, V., & Arul, V. (2011). Cryopreservation and microencapsulation of probiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastroenestinal conditions. *Biotechnology and Bioprocess Enginneering, 16,* 1106-1114.

Karlsson, C. L., Onnerfält, J., Molin , G., Ahrné, S., & Thorngren-Jerneck, K. (2012). The microbiota of the gut in preschool children with normal and excessive body weight. *Obesity (Silver Spring), 20,* 2257-2261.

Karthikeyan, N., Elango A., Kumaresan, G., Gopalakrishnamurty, T. R., & Raghunath, B. V. (2014). Enhancement of probiotic viability in ice cream by microencapsulation. International Journal of Science, *Environmental Technology, 3*(1), 339 – 347.

Khorasani, A. C., & Shojaosadati, S. A. (2017). Pectin-starch nanofibers biocomposites as novel gastrointestinal-resistant probiotics. *International Journal of Biological Macromolecules, 94,* 131-144.

Kınık, Ö., & Gürsoy, O. (2006). Probiyotik bakterilerin klinik uygulamalarında yeni gelişmeler-I. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 43,* 181-188.

Kim, H. J., Kim, Y. J., Kang, M. J., Seo, J. H., Kim, H. Y., Jeong, S. K., Lee, S. H., Kim, J. M., & Hong, S. J. (2012). A novel mouse model of atopic dermatitis with epicutaneous allergen sensitization and the effect of *Lactobacillus rhamnosus*. *Experimental Dermatology*, (9), 672-675.

Klaenhammer, T. R. (2001). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers.* AMS press, (p.797-800). Washington DC.

Klaenhammer, R. T., & Kullen, J. M. (1999). Selection and design of properties. *International Journal of Food Microbiology,* 50, 45-57.

Kognoff, M. F. (1993). Immunology of the intestinal tract. *Gastroenterology, 105,* 1275-1280.

Kutlu, T. (2001). İshalli Çocuğun Beslenmesi ve Oral Rehidratasyon Tedavisi. Pediatrik Aciller Sempozyumu. 14-15 Haziran. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal, 13*(1), 3 –13.

Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science, 37*(1), 106 - 126.

Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (1993). *Principles of Biochemistry.* second ed., 468, New York.

Lin, H. C., Su, B. H., Chen, A. C., Lin, T. W., Tsai, C. H., Yeh, T. F., & Oh, W. (2005). Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis invery low birth weight infants. *Pediatrics, 115*(1), 1- 4.

Macfarlane, G.T., Steed, H., & Macfarlane, S. (2008). Bacterial metabolism and health related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology, 104*(2), 305-44.

Mandrachia, B., Palpacue, R. J., Nazzaro, F., Bianco, V., Rega, R., Ferraro, P., & Grilli, S. (2018). Biospeckle decorrelation quantifies the performance of alginate-

encapsulated probiobiotic bacteria. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, 25*(1), 1- 6.

Manojlovic, V., Nedovic, V. A., Kailasapathy, K., & Zuidam, N. J. (2010). *Encapsulation of probiotics for use in food products, Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. (p. 269-302).Springer-Verlag New York,

Margaritis, A., & Merchant, F. J. A. (1984). Advences in ethanol production using immobilized cell systems. *CRC Critical Review in Biotechnology*, *1*(4), 339-393.

Markowiak, P., & Slizewska, K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health, *Nutrients, 9*(9), 1-30.

Marx, S. P., Winkler, S., & Hartmeier, W. (2000). Metabolization of b-(2,6)-linked fructoseoligosaccharides by different bifidobacteria. *FEMS Microbiol. Letters, 182,* 163-169.

Nadal, I., Santacruz, A., Marcos, A., Warnberg, J., Garagorri, J. M., Moreno, L. A., Martin-Matillas, M., Campoy, C., Martí ,A., Moleres, A., Delgado, M., Veiga, O. L., García-Fuentes, M., Redondo, C. G. & Sanz, Y. (2009). Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents. *International Journal of Obesity, 33,*758–767.

Nase, L., Hatakka, K., Savilahti, E., Saxelin, M., Ponka, A., Poussa, T., Korpela, R., & Meurman, J. H. (2001). Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Research, 35*(6), 412-420.

Necas, J. & Bartosikova, L. (2013) Carrageenan: a review. *Veterinarni Medicina*, *58*(4), 187–205.

Oh, Y., Osato, H., Bennett, G., & Hong, W. K. (2002). Folk Yoghurt kills *Helicobacter pylori*. *Journal of Applied Microbiology, 93,* 1083-1088.

Oktay, E. (2001). İnflamatuar Bağırsak Hastalıkları: Etyopatogenez, Semptomatoloji, Tanı ve Komplikasyonlar. Gastrointestinal Sistem Hastalıkları Sempozyumu. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul.

Önal, D. ,Yavuz Beyatlı, Y., & Aslım, B.(2005). Probiyotik Bakterilerin Epitel Yüzeylere Yapışması. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 3*(9), 1-10.

Özbaş, Y. (1995). Bifidobakteriler ve *Lactobacillus acidophilus*: Özellikleri, kullanımları, yararlı etkileri ve ürün uygulamaları. *Gıda Teknolojisi Dergisi, 18,* 247-251.

Özden, A. (2007). Yoğurt ve sağlıklı yaşam. *Güncel Gastroenteroloji, 11*(3), 166- 178.

Öztürk, N. (2006). *Hidrofobik nanoyapılarda Candida rugosa lipaz immobilizasyonu*. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.

Öztürk, R. (2007). Akut İshal: Etyoloji, Patogenez, Tanı ve Tedavi. Türkiyede Sık Karşılaşılan Hastalıklar I Sempozyumu. Ocak. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul

Pal, M., & Jadhav, V. (2013). Significance of probiotics in human health. *Beverage & Food World*. 65-67.

Park, K. Y., Kim, B., & Hyun, C. K. (2015a). Lactobacillus rhamnosus GG reverses insulin resistance but does not block its onset in diet-Induced obese mice. *Journal Microbiology & Biotechnology, 25*(5),753-757.

Park, K. Y., Kim, B., & Hyun, C. K. (2015b). *Lactobacillus rhamnosus* GG improves glucose tolerance through alleviating ER stress and suppressing macrophage

activation in db/db mice2. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition56*(3), 240–246.

Pothuraju, R., Sharma, R. K., Chagalamarri, J., Kavadi, P. K. & Jangra, S. (2015). Influence of milk fermented with *Lactobacillus rhamnosus* NCDC 17 alone and in combination with herbal ingredients on diet induced adiposity and related gene expression in C57BL/6J mice. *Food & Function, 6*(11), 3576-3584.

Prasanna, P. H. P., & Charalampopoulos, D. (2019). Encapsulation in an alginate-goast milk-inulin matrix improves survival of probiotic Bifidobacterium in simulated gastrointestinal conditions and goast milk. *International Journal of Dairy Technology, 72*(1), 132-141.

Rafter, J.(2002). Lactic acit bacteria and cancer: mechanistic perpective. *British Journal of Nutrition, 88*(Suppl. 1), 89-94.

Rastall, A. R., & Maitin, Y. (2002). Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. *Current Opinion in Biotechnology, 13,* 490-496.

Rao, V. A. (2001). The prebiotic properties of oligofructose at low intake levels. *Nutrition Research, 21,* 843-848.

Reis, J.A., Paula, A.T., Casarotti, S., Penna, A. L. B. (2012). Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications penna, *Food Engineering Reviews, 4*, 124–140.

Salminen, S., Deighton, M. A., Benno, Y., & Gorbach, S. L. (1998). *Lactic acid bacteria in health and disease. In Lactic Acid Bacteria.* ed. Salminen, S. and von Wright, A., (P.211–253). New York.

Sanchez, M,, Darimont, C., Drapeau, V., Emady-Azar, S., Lepage, M., Rezzonico, E., Ngom-Bru, C., Berger B., Philippe, L., Ammon-Zuffrey, C., Leone, P., Chevrier,

G., St-Amand, E., Marette, A., Doré, J., .& Tremblay, A. (2014). Effect of *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC1.3724 supplementation on weight loss and maintenance in obese men and women. *British Journal of Nutrition, 111*(8),1507-19.

Santacruz , A., Marcos, A., Wärnberg, J., Martí, A., Martin-Matillas, M., Campoy, C., Moreno, L. A., Veiga, O., Redondo-Figuero, C., Garagorri, J. M., Azcona, C., Delgado, M., García-Fuentes, M., Collado, M.C., & Sanz, Y.. (2009). Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity (Silver Spring), 17,*1906-1915.

Scragg, A. H. (1988) *Biotechnology for Engineers*. John Wiley and Sons, 322-337, England.

Sedefoğlu, S. (2014). *Enkapsülasyon işleminin dondurma depolama periyodu boyunca probiyotik Lactobacillus acidophilus stabilitesi üzerine etkisi.* Atatürk Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum

Segers, M. E., & Lebeer, S. (2014). Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG - host interactions. *Microbial Cell Factories, 13*(Suppl 1), 1-16.

Sezen, A.G. (2013). Prebiyotik, probiyotik ve sinbiyotiklerin insan ve hayvan sağlığı üzerine etkileri. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, 8*(3), 248-258.

Shi, L. E., Li, Z. H., Li, D. T., Xu, M., Chen, H. Y., Zhang, Z. L., & Tang, Z. X. (2013). Encapsulation of probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in alginate-milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Food Engineering, 117,* 99-104.

Shin, H. S., Lee, H., Pestka, J. J., & Ustunol, Z. (2000). Growth and viability of commercial Bifidobacterium spp. in skim milk containing oligosaccharides and inulin. *Journal of Food Science, 65,* 884-887.

Solga, S. F. (2003). Probiotics can treat hepatic encephalopathy. *Medical Hypotheses, 61(2),* 307-313.

Su, R., Zhu, X. L., Fan, D. D., Mi, Y., Yang, C. Y., & Jia X. (2011). Encapsulation of probiotic Bifidobacterium longum BIOMA 5920 with alginate-human-like collagen and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Biological Macromolecule., 49,* 979-984.

Szajewska, H., & Kołodziej, M. (2015). Systematic review with meta-analysis, *Lactobacillus rhamnosus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children and adults. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 42*(10), 1149-1157.

Şener, A., Temiz, A., Toğay, S. Ö., & Bağcı, U. (2008). Çeşitli prebiyotiklerin Bifidobacterium animalis subsp. lactis Bb-12'nin gelişimi ve asitlik geliştirme özelliği üzerine in vitro etkileri. Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü. Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum.

Telefoncu, A., 1999, *Enzim immobilizasyonu, Enzimoloji.* Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, Kuşadası, Türkiye, (s.193-248), Ege Üniversitesi, Basımevi, İzmir.

Tok, E., & Aslım, B. (2007). Probiyotik olarak kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin kolesterol asimilasyonu ve safra tuzları dekonjugasyonundaki rolleri. *Türk Mikrobiyol Cemiyeti Dergisi, 37*(1), 62-68.

Trabelsi, I., Bejar W., Ayadi, D., Chouayekh, H., & Kammoun, R. (2013). Encapsulation in alginate and alginate coated-chitosan improved the survival of newly probiotic in oxgall and gastric juice. *International Journal of Biological Macromolecules, 61,* 36-42.

Turan, İ., & İlter, T. (2007). Kafkas Dağlarından Günümüze: Kefir. *Güncel Gastroenteroloji, 11*(2), 65-75.

Tunç, M. A. (2007). *Humatların koyunlarda rumen parametreleri ve bazı kan değerleri üzerine etkisi.* Atatürk Üniv. Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları A.D., Erzurum.

Tuomola, E. M., Ouwehand, A. C., & Salminen, S. J. (1999). The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogensto human intestinal mucus. *FEMS Immunology & Medical Microbiology, 26*, 137-142.

Ünal, E., & Erginkaya, Z. (2010). Probiyotik mikroorganizmaların mikroenkapsülasyonu. *Gıda, 35,* 297-304.

Vajro, P., Mandato, C., Licenziati, M. R., Franzes, A., Vitale, D. F., Lenta, S., Caropreso, M., Vallone, G., & Meli, R. (2011). Effects of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in pediatric obesity-related liver disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 52*(6), 740-743.

Vanderhoof, A., & Rosemary, Y. (2002). Probiotics in pediatrics. *Pediatrics, 109,* 956-958.

Vrese, M., & Schrezenmeir, J. (2002). Probiotics and non-intestinal infectious conditions. *British Journal of Nutrition, 88* (Suppl. 1), 59-66.

Waitzberg, D. L., Loqullo, L. C., Bittencourt, A. F., Torrinhas, R. S., Shiroma, G. M., Paulino, N. P. & Teixeira-da-Silva, M. L. (2013). Effect of synbiotic in constipated adult women– A randomized, double-blind, placebo-controlled study of clinical response. *Clinical Nutrition, 1*, 27-33.

Wu, Y. & Zhang, G. (2018). Synbiotic encapsulation of probiotic *Lactobacillus plantarum* by alginate-arabinoxylan composite microspheres. *LWT_Food Science and Technology, 93,* 135-141.

Yağcı, R. (2002). Prebiyotikler ve probiyotikler. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi, 45,* 337-344.

Yang, E., Fan, L., Jiang, Y., Doucette, C., & Fillmore, S. (2012). Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts, *AMB Express, 2*(48), 1-12.

Yangılar, F., (2015). Probiyotik mikroorganizmaların biyokoruyucu özelliği. *Uludağ Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi, 20*(1), 119-130.

Yaygın, H. (1999). *Yoğurt Teknolojisi.* Akdeniz Üniversitesi Yayınları. Akdeniz üniversitesi Baımevi, No: 75, Antalya.

Yılmaz, M. (2004). Prebiyotik ve Probiyotikler. *Güncel Pediatri. 2,* 142-145.

Zhao, H. Y., Wang, H. J., Lu, Z., & Xu, S.Z. (2004). Intestinal microflora in patients with liver cirrhosis. Chinese *Journal of Digestive Diseases, 5*(2), 64-67.

Zubillaga, M., Weill, R., Postaire, E., Goldman, C., Caro, R., & Boccio, J. (2001). Effects of probiotics and functional foods and their use in different diseases. *Nutrition Research, 21*(3), 569-579.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Begüm SIDAL

Doğum Tarihi: 24.07.1993

Doğum Yeri: EDİRNE

Akademik Unvanı: Diyetisyen

Eğitim Bilgileri

Derece	**Bölüm/Program**	**Okul/Üniversite**	**Yıl**
Lise	Sayısal	Edirne Anadolu Öğretmen Lisesi	2011
Lisans	Beslenme ve Diyetetik	Trakya Üniversitesi	2017
Y. Lisans	Biyoteknoloji ve Genetik	Trakya Üniversitesi	2019

Yüksek Lisans Tez Başlığı ve Tez Danışman(lar)ı:

Tez Başlığı: Probiyotik Kültür İmmobilizasyonu; Stabilite ve Optimizasyon Çalışmaları.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Halide AYDOĞDU

Projelerde Yaptığı Görevler: Probiyotik Kültür İmmobilizasyonu, Stabilite ve Optimizasyon Çalışmaları, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Projesi, Proje no:2018/288 -Yardımcı Araştırıcı

Deneyimler:

Haydarpaşa GATA Eğitim ve Araştırma Hastanesi(Stajyer Diyetisyen,2 ay)

Özel Ekol Hastanesi (Stajyer Diyetisyen, 2 ay)

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi (Stajyer Diyetisyen,1 yıl)

Trakya Üni. FBE, Biyoteknoloji ve Genetik ABD Tezli Yüksek Lisans (2017-2019)

Kurslar, Sempozyumlar ve Sertifikalar:

İşte İletişim ve Kişisel İletişim (Educon, 10.11.2013)

İletişim Yönetimi (Educon, 10.11.2013)

Özel Saha Diyetisyenliğine Genel Bakış Paneli (TÜ SABEYAT 02.12.2013)

İşte Proie (TC. Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı) (15.03. 2014)

II. TÜ Beslenme ve Diyetetik Sempozyumu (11-12.04. 2014)

ISO 22000:2005 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi Temel Bilgilendirme ve İç Denetçi Eğitimi (kurs bitimi sonrası başarılı olunduğuna dair sertifika) (19-20.12. 2014)

III. TÜ Beslenme ve Diyetetik Sempozyumu, "Çocuk Hastalıklarında Beslenme (14-15.05. 2015)

Malnütrisyon ve Beslenme Durumunun Değerlendirilmesi Kursu (TDD, 4-5.06. 2016)

Egzersiz ve Beslenme Söyleşisi (Uzm. Dyt. Orçun Kürüm, 09.05. 2017)

IV. TÜ Beslenme ve Diyetetik Sempozyumu, "Güncel Yaklaşımlarla Beslenme" (27-28.04. 2017)

İmmünoloji Okulu, Türk İmmünoloji Derneği XII. Bölgesel Sempozyumu (26-27.10. 2017)

Bariatrik Cerrahi ve Beslenme Sempozyumu (TDD, 24 – 25.03.2018)