

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MİKROENKAPSÜLE EDİLEN *Pediococcus pentosaceus* OZF SUŞUNUN  
ADEZYON VE İMMUNMODÜLATÖR ETKİSİNİN İN VİVO KOŞULLARDA  
BELİRLENMESİ**

**Mohamed MOKRANI**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA  
2014**

**Her hakkı saklıdır**

## **ETİK**

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

12/05/2014

**MOHAMED MOKRANI**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### MİKROENKAPSÜLE EDİLEN *Pediococcus pentosaceus* OZF SUŞUNUN ADEZYON VE İMMUNMODÜLATÖR ETKİSİNİN İN VİVO KOŞULLARDA BELİRLENMESİ

Mohamed MOKRANI

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

Bu çalışmada, önceki çalışmalarımız neticesinde anne sütünden izole edilen ve gelecek vaad eden probiyotik bir bakteri olan *Pediococcus pentosaceus* OZF suşu kalsiyum aljinat (%2) ve peynir altı suyu proteinleri (%5) kullanılarak enkapsüle edilmiş ve ardından liyofilize edilmiştir. Hazırlanan kapsüllerin yüzey morfolojileri taramalı elektron mikroskopunda (SEM) analiz edilmiştir. Peynir altı suyu proteinleri ile kaplanan aljinat kapsüllerine hapsedilen OZF suşunun canlılığında 6 ay boyunca 4°C’de hiçbir kayıp olmadığı ve kararlı kaldığı bulunmuştur. Enkapsüle edilmiş OZF suşu pH, safra tuzu, pepsin ve pankreatin gibi simüle edilmiş gastrik ve intestinal koşullarda da canlı bulunmuştur. Kapsüle edilen ve edilmeyen OZF’nin gastrointestinal sistemden geçişi, adezyonu ve aynı zamanda sırasıyla mikrobiyolojik sayım, qPZR ve DGGE kullanılarak fekal mikrobiyota çeşitliliği üzerine olan etkisi kemirgen modelinde (Balb/C fare) analiz edilmiştir. OZF suşu beslemeyi takip eden 6. saatte fekal örneklerde tespit edilmiş, en yüksek oranına 10. saatte ulaşmış ve ardından düşüşe geçerek 24. saatte tamamen kaybolmuştur. 15. gün beslemeyi takip eden 24. saatte, bağırsağa tutunan bakteri sayısı belirlenmiştir. Çalışmanın başlangıcında, her hayvana 8 log kob uygulama yapılmış ve kapsüle edilmeyen OZF ile beslenen grupta bu sayı 2 log olarak bulunmuştur. Bu durum 24 saatte gastrointestinal sisteme tutunan OZF sayısında 6 log azalma olduğunu göstermektedir. Enkapsüle edilen suşun tutunma özelliği de benzer bulunmuştur (2.5 log,  $p>0.05$ ). Genel mikrobiyotadaki fekal mikrobiyota kompozisyonu bifidobakteriler, *Lactobacillus*, *E.coli* ve bakterioides gibi dominant gruplar açısından ilişkilendirilse de, kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenememiştir.

**Nisan 2014, 80 sayfa**

**Anahtar kelimeler:** *Pediococcus pentosaceus*, enkapsülasyon, tutunma, mikrobiyota

## ABSTRACT

Master Thesis

### DETECTION OF ADHESION AND IMMUNOMODULATORY EFFECT OF MICROENCAPSULATED *Pediococcus pentosaceus* OZF STRAIN IN VIVO CONDITIONS

Mohamed MOKRANI

Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ozlem OSMANAGAOGLU

In this study, a promising probiotic bacterium *Pediococcus pentosaceus* OZF which had been isolated from human breast milk in our previous studies were encapsulated with calcium alginate (2% ) and whey (5%) proteins, followed by lyophilization. Surface morphologies of the prepared capsules were analyzed under scanning electron microscope (SEM). OZF containing alginate capsules that were coated with whey proteins was found to be stable at 4°C for 6 months without loss of any viability, and encapsulated OZF was found to be viable in simulated gastric and intestinal juice conditions such as pH, bile salts, pepsin and pancreatin. Transit of capsulated and noncapsulated OZF through gastrointestinal system, their adhesions as well as their effects on faecal microbiota variations were analyzed on murine model (Balb/C mice) by microbiological counts, qPCR and DGGE, respectively. OZF strain was detected in fecal samples of animal followed by 6 hours after feeding, reached the highest value in 10th hours and started to decrease after and lost completely at 24 hr. At 24 hours following the 15th day of feeding, the number of bacteria adhered to the intestine was determined. At the beginning of the trial, 8 log cfu was applied per animal and 2 log was found in the group feed with nonencapsulated OZF, which means there was 6 log decrease in the adhesion of OZF to gastrointestinal system at 24 hr. Adhesion properties of encapsulated strain was also found to be the same (2.5 log,  $p>0.05$ ). As far as the fecal microbial composition on the general microbiota is concerned in terms of dominant groups such as bifidobacteria, *Lactobacillus*, *E.coli* and bacterioides, no significant differences were recorded between control and experimental groups.

**April 2014, 80 pages**

**Key Words:** *Pediococcus pentosaceus*, encapsulation, adhesion, microbiota

## TEŞEKKÜR

“*Pediococcus pentosaceus* OZF suşunun enkapsülasyonu **BAP 13L4240017**”konulu yüksek lisans tez çalışmasının bir bölümü, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinasyon Birimi tarafından öğrenci projesi olarak desteklenmiştir .

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgisinden faydalandığım, yanında çalışmaktan mutluluk duyduğum, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ve manevi desteğini her zaman yanımda hissettiğim çok değerli hocam Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU’na (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı)

Beni ekibine kabul eden, yol gösteren, laboratuvar imkanlarını sonuna kadar kullanmamı sağlayan, Prof.Dr Maria Urdaci’ye Bordeaux Üniversitesi (Fransa) CBMN ekibi.

Tez savunmasında değerli tavsiye ve yönlendirmeleri ile tezime katkıda bulunan sayın hocalarım Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ(Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı) ve Doç. Dr. Mayda GÜRSEL’e.(Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı)

Araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda olduğu kadar beşeri ilişkilerde de engin fikirleriyle yetişme ve gelişmeye katkıda bulunan Dr. Fadime KIRAN’a.

Mikrobiyal Genetik Laboratuvarında birlikte çalıştığım ve her zaman yanımda hissettiğim, canım arkadaşlarım Kübra ALMACIOĞLU, Zhanatgul SAKYP, Hande MADEN, Erol KARATAŞ, Hande ORAL ve Araş. Grv. Harun Önlü’ye.

In vivo ve moleküler teknikler konusunda kendilerinden çok şeyler öğrendiğim Bordeaux Üniversitesi (Fransa) CBMN ekibinden Anne-Marie ELIE ve Claudine JACQUOT’a, projeler kapsamında birlikte çalıştığım arkadaşlarım Pauline, Ipsita, Romain,Gabrielle , Doç. Dr Muriel DENAYROLLE, Prof.Dr Roland CAUBET, Doç. Dr. Benoît GROSSIORD ile laboratuvarında birlikte çalıştığım tüm arkadaşlarıma ve teknisyenler Annie, Pascale ve Michelle’ ye.

Son olarak; her koşulda yanımda olan, sonsuz bir sabırla her konuda desteklerini esirgemeyen tüm arkadaşlarıma ve manevi desteklerinden güç bulduğum sevgili aileme.....

Mohamed MOKRANI  
Ankara,Mayıs 2014

## İÇİNDEKİLER

### TEZ ONAY SAYFASI

|                                                                             |      |
|-----------------------------------------------------------------------------|------|
| ETİK .....                                                                  | i    |
| ÖZET .....                                                                  | ii   |
| ABSTRACT .....                                                              | iii  |
| TEŞEKKÜR .....                                                              | iv   |
| SİMGELER DİZİNİ .....                                                       | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                       | x    |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                     | xii  |
| 1. GİRİŞ .....                                                              | 1    |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ .....                                                    | 3    |
| 2.1 Probiyotikler .....                                                     | 3    |
| 2.1.1 Probiyotik tanımı ve tarihçesi .....                                  | 3    |
| 2.1.2 Probiyotiklerin seçim kriterleri ve muhtemel etki mekanizmaları ..... | 5    |
| 2.1.3 Probiyotiklerin tıbbi amaçlı kullanım alanları .....                  | 7    |
| 2.1.4 Fonksiyonel gıdalar .....                                             | 11   |
| 2.2 Enkapsülasyon .....                                                     | 13   |
| 2.3 Mikrobiyota .....                                                       | 14   |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM .....                                                 | 18   |
| 3.1 Materyal .....                                                          | 18   |
| 3.1.1 Bakteri kültürleri ve gelişme koşulları .....                         | 18   |
| 3.1.2 Deney hayvanlarının temini .....                                      | 18   |
| 3.1.3 Çözelti ve malzemelerin sterilizasyonu .....                          | 19   |
| 3.1.4 Moleküler markörler .....                                             | 19   |
| 3.1.5 Besiyerleri ve tamponlar .....                                        | 19   |
| 3.1.6 Kimyasallar .....                                                     | 19   |
| 3.2 Yöntem .....                                                            | 19   |
| 3.2.1 Enkapsülasyon .....                                                   | 19   |
| 3.2.1.1 Bakteri kültürün hazırlanması .....                                 | 19   |
| 3.2.1.2 Enkapsülasyon işlemi .....                                          | 20   |
| 3.2.1.3 Peynir altı suyu proteinlerinin sterilizasyonu.....                 | 21   |

|                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.1.4 Liyofilizasyon.....                                                                                                                         | 21 |
| 3.2.2 Kapsül yapılarının taramalı elektron mikroskopta (SEM) analizleri .....                                                                       | 21 |
| 3.2.3 Kapsüllerin depolama stabilitelerinin belirlenmesi.....                                                                                       | 21 |
| 3.2.4 Kapsüllerin <i>in vitro</i> gastrointestinal sistem koşullarında dayanıklılıklarının belirlenmesi .....                                       | 22 |
| 3.3.4.1 Düşük pH değerlerine karşı dayanıklılıklarını belirlenmesi .....                                                                            | 22 |
| 3.3.4.2 Pepsine karşı dayanıklılıklarını belirlenmesi .....                                                                                         | 22 |
| 3.3.4.3 Pankreatine karşı dayanıklılıklarını belirlenmesi .....                                                                                     | 22 |
| 3.3.4.4 Safra tuzuna karşı dayanıklılıklarını belirlenmesi .....                                                                                    | 23 |
| 3.2.5 <i>In vivo</i> çalışmalar .....                                                                                                               | 23 |
| 3.2.5.1 Kapsüle edilmiş <i>Pediococcus pentosaceus</i> OZF suşunun fare gastrointestinal sisteminden canlılığını koruyarak geçişinin belirlenmesi . | 24 |
| 3.2.5.2 Kapsüle edilmiş <i>Pediococcus pentosaceus</i> OZF suşunun bağırsağa tutunma (adezyon) kapasitelerinin belirlenmesi .....                   | 25 |
| 3.2.5.3 Kapsüle edilmiş <i>Pediococcus pentosaceus</i> OZF suşunun mikrobiyota üzerine etkisinin belirlenmesi .....                                 | 25 |
| 3.2.5.3.1 Kantitatif PZR (q-PZR) .....                                                                                                              | 25 |
| 3.2.5.3.2 Denatüre gradient jel elektroforezi (DGGE) ve klonlama .....                                                                              | 26 |
| 3.2.6 İstatistiksel analizler .....                                                                                                                 | 27 |
| 4. BULGULAR .....                                                                                                                                   | 28 |
| 4.1 Kapsüllerin Morfolojik Yapıları.....                                                                                                            | 28 |
| 4.2 Enkapsülasyon İşleminin OZF Suşunun Canlılığı Üzerine Etkisi.....                                                                               | 31 |
| 4.3 Kapsüllerin Depolama Stabiliteleri .....                                                                                                        | 32 |
| 4.4 Kapsüllerin <i>in vitro</i> Gastrointestinal Sistem Koşullarında Dayanıklılıkları .....                                                         | 32 |
| 4.5 <i>In vivo</i> Çalışmalar .....                                                                                                                 | 36 |
| 4.5.1 Kapsüle edilmiş <i>Pediococcus pentosaceus</i> OZF suşunun fare gastrointestinal sisteminden canlılığını koruyarak geçişi .....               | 36 |
| 4.5.2 Kapsüle edilmiş <i>Pediococcus pentosaceus</i> OZF suşunun bağırsağa tutunma (adezyon) kapasitesi .....                                       | 39 |
| 4.5.3 Kapsüle edilmiş <i>Pediococcus pentosaceus</i> OZF suşunun mikrobiyota üzerine etkisi.....                                                    | 41 |
| 4.5.3.1 Kantitatif PZR (q-PZR) .....                                                                                                                | 41 |

|                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| 4.5.3.2 Denatüre gradient jel elektroforez (DGGE) ve klonlama ..... | 42 |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....                                          | 46 |
| KAYNAKLAR .....                                                     | 52 |
| EKLER .....                                                         | 64 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                      | 80 |

## SİMGELER DİZİNİ

|                   |                                                                                             |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| A                 | Adenin                                                                                      |
| bç                | Baz çifti                                                                                   |
| C                 | Sitozin                                                                                     |
| CaCl <sub>2</sub> | Kalsiyum klorür                                                                             |
| °C                | Santigrat (Celcius) derece                                                                  |
| DGGE              | Denatüre Gradient Jel Elektroforezi                                                         |
| DNA               | Deoksiribonükleik asit                                                                      |
| EDTA              | Etilendiamintetraasetik asit                                                                |
| EtBr              | Etidyum bromit                                                                              |
| F                 | İleri (Forward)                                                                             |
| FAO               | Tarım ve Gıda Örgütü (Food and Agriculture Organization)                                    |
| FTS               | Fizyolojik tuzlu su                                                                         |
| G                 | Guanin                                                                                      |
| g                 | Gram                                                                                        |
| Gİ                | Gastro İntestinal                                                                           |
| GRAS              | Genel olarak güvenli kabul edilir<br>(Generally recognized as safe)                         |
| HCl               | Hidroklorik asit                                                                            |
| IFN               | Interferon                                                                                  |
| IgA               | İmmunoglobülin A                                                                            |
| IL                | İnterlökin                                                                                  |
| Kbp               | Kilobazçifti                                                                                |
| kDa               | Kilodalton                                                                                  |
| kg                | Kilogram                                                                                    |
| kob               | Koloni oluşturan birim (cfu: colony forming unit)                                           |
| L                 | Litre                                                                                       |
| LAB               | Laktik asit bakterileri                                                                     |
| Log               | Logaritma                                                                                   |
| M                 | Molarite                                                                                    |
| Mg                | Magnezyum                                                                                   |
| mg                | Miligram                                                                                    |
| ml                | Mililitre                                                                                   |
| mM                | Milimolar                                                                                   |
| MRS               | De Man, Rogosa and Sharpe besiyeri                                                          |
| NaCl              | Sodyum klorür                                                                               |
| NaOH              | Sodyum hidroksit                                                                            |
| NCBI              | Uluslararası biyoteknoloji bilgi merkezi<br>(National Center for Biotechnology Information) |
| Ng                | Nanogram                                                                                    |
| OD                | Optik yoğunluk                                                                              |
| PBS               | Fosfat tamponlu tuz solüsyonu (Phosphate-buffered saline)                                   |
| PZR               | Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)                                     |
| pH                | Hidrojen konsantrasyonunun logaritması                                                      |
| R                 | Geri (Revers)                                                                               |
| rDNA              | Ribozomal deoksiribonükleik asit                                                            |

|               |                                                 |
|---------------|-------------------------------------------------|
| RNA           | Ribonükleik asit                                |
| rRNA          | Ribozomal ribonükleik asit                      |
| sn            | Saniye                                          |
| T             | Timin                                           |
| Th            | T yardımcı (T helper)                           |
| TNF           | Tümör nekrozis faktör                           |
| UV            | Ultra viyole                                    |
| V             | Volt                                            |
| WHO           | Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation) |
| $\mu$         | Mikro                                           |
| $\mu\text{g}$ | Mikrogram                                       |
| $\mu\text{L}$ | Mikrolitre                                      |
| $\mu\text{M}$ | Mikromolar                                      |
| %             | Yüzde                                           |
| $\alpha$      | Alfa                                            |
| $\beta$       | Beta                                            |
| $\gamma$      | Gama                                            |
| >             | Büyük                                           |
| <             | Küçük                                           |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|            |                                                                                                                                                                                |    |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1  | Probiyotiklerin muhtemel etki mekanizmalarının şematik sunumu.....                                                                                                             | 7  |
| Şekil 2.2  | İntestinal mikrobiyota içeriğinin şematik görünümü .....                                                                                                                       | 15 |
| Şekil 3.1  | Enkapsülasyon işleminin şematik görünümü .....                                                                                                                                 | 20 |
| Şekil 4.1  | Kapsüllerin makroskobik görüntüsü; a: <i>P. pentosaceus</i> OZF suşunu içeren aljinat+peynir altı suyu ile kaplanan kapsüller, b: Boş aljinat kapsülleri; c: kapsül çapı ..... | 28 |
| Şekil 4.2  | <i>P. pentosaceus</i> OZF içeren aljinat kapsüllerinin SEM görüntüsü .....                                                                                                     | 30 |
| Şekil 4.3  | <i>P. pentosaceus</i> OZF, aljinat ve peynir altı suyu proteinleri ile kaplanan kapsüllerin SEM görüntüsü .....                                                                | 31 |
| Şekil 4.4  | Depolama süresince kapsüle edilmiş <i>P. pentosaceus</i> OZF suşunun canlılığı.....                                                                                            | 32 |
| Şekil 4.5  | Kapsüle edilen ve edilmeyen <i>P. pentosaceus</i> OZF suşunun düşük pH ortamlarında canlılık durumu.....                                                                       | 34 |
| Şekil 4.6  | Kapsüle edilen ve edilmeyen <i>P. pentosaceus</i> OZF suşunun pepsin ortamlarında canlılık durumu.....                                                                         | 35 |
| Şekil 4.7  | Kapsüle edilen ve edilmeyen <i>P. pentosaceus</i> OZF suşunun safra tuzu ortamlarında canlılık durumu .....                                                                    | 37 |
| Şekil 4.8  | Kapsüle edilen ve edilmeyen <i>P. pentosaceus</i> OZF suşunun pankreatin ortamlarında canlılık durumu .....                                                                    | 38 |
| Şekil 4.9  | Beslemeyi takip eden ilk 24 saatlik süreçte deney grubu fekal numunlerinde tespit edilen bakteri sayım sonuçlarına ait grafik.....                                             | 38 |
| Şekil 4.10 | Pediyosin ACh/PA-1 üretiminden sorumlu gen bölgesi temel alınarak tasarlanan primerlerin kullanımıyla elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü .....      | 39 |
| Şekil 4.11 | Kontrol ve deney grubuna ait farelerin ileumlarına ait DNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü .....                                                               | 40 |
| Şekil 4.12 | Kontrol ve deney gruplarında bağırsağa tutunan bakteri sayısını gösteren q-PZR sonuçları .....                                                                                 | 41 |
| Şekil 4.13 | Kontrol ve deney grubuna ait farelerin feçeslerine ait DNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü .....                                                               | 41 |

|            |                                                                                                                                  |    |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.14 | Kontrol ve deney gruplarına ait fekal örneklerde tespit edilen farklı bakteri gruplarının sayısını gösteren q-PZR sonuçları..... | 43 |
| Şekil 4.15 | Kontrol ve deney grubuna ait farelerin fekal örneklerinden çoğaltılan 16S rDNA gen bölgelerinin DGGE görüntüsü .....             | 44 |
| Şekil 4.16 | DGGE profillerinin kümeleme analizi .....                                                                                        | 45 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 2.1 Probiyotiklerin bazı olumlu etkileri ve muhtemel mekanizmaları .....      | 8  |
| Çizelge 3.1 <i>In vivo</i> denemelerde kullanılan gruplar ve uygulama şekilleri ..... | 23 |
| Çizelge 3.2 PZR çalışmalarında kullanılan primerler .....                             | 26 |

## 1. GİRİŞ

Fonksiyonel gıdalar son yıllarda hayatımızın önemli bir parçasını oluşturmaktadır. İnsanlar artık metabolizmaya yararlı ve hastalıklardan korunmaya yardımcı gıdalara yönelmektedirler. İntestinal sistem-probiyotik etkileşimi ile ilgili bilgiler henüz tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen gelişmekte olan bilimsel çalışmalar probiyotiklerin insan hastalıklarındaki terapötik potansiyelini ve etki mekanizmasını ortaya koymaktadır. Bu amaçla insanlarda ve hayvanlarda kullanım için lisanslı yeni probiyotik ürünlerin geliştirilmesine olan ilgi artmıştır. Yararlı etkileri göz önüne alındığında, probiyotik suşların özellikle gastrointestinal (Gİ) sistem rahatsızlıklarında, hayvansal verimin arttırılmasında ve endüstriyel arıtmada gelecek vaat eden ajanlar olarak oldukça önemli bir çalışma alanı oluşturacağı tartışmasız bir gerçektir.

Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar, bazı hastalıkların bağırsak mikrobiyal ekosistemineki olağanüstü dengenin bozulması neticesinde meydana geldiğini göstermektedir. Özellikle inflamatuvar bağırsak hastalıkları başta olmak üzere, obezite, ekzema, otizm ve bazı metabolik belirtilere bağlı birçok sağlık sorununun fekal flora kompozisyonunun ve intestinal mukozal komünitesinin değişmesi ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Probiyotikler ve prebiyotikler ise mikrobiyota ile konak arasında dengeyi korumak adına olumlu sonuçlar sergilemektedirler. Ancak bu olumlu etkilerinin yanında, oral biyoterapinin en büyük sınırlamalarından biri canlı bakteri alımının karmaşıklığıdır. Probiyotiklerin, kona ğın Gİ yolunda gastrik geçiş sürecinde hayatta kalma yüzdelerinin zayıf olması ve buna bağlı olarak canlı olmayan bakterilerin potansiyel derecede etkili olamayabileceği için endişe uyandırmaktadır. Çünkü probiyotikler “canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlanmaktadırlar. Bundan dolayı, probiyotik olarak seçilen suşlar, potansiyel etkilerini gösterebilmeleri için, intestinal sisteme ulaşana kadar gastrik yolda mutlaka canlı kalabilmelidirler. İnsanlar tarafından tüketilen probiyotik bir ürünün kolona yeterli sayıda canlı ulaşarak sağlık üzerine olumlu etkiler sergilemesi için ürün içerisindeki probiyotik organizma sayısının en az 1 milyon olması gerekmektedir. Ürün tüketildiğinde, probiyotik suşun hedef bölgeye ulaşana kadar asit ve safra tuzu gibi stres faktörlerinde canlılığını korumasının yanı sıra ürün oluşum ve depolanma sürecinde de canlılığını muhafaza etmesi gerekmektedir.

Probiyotik-enkapsülasyon tekniği bu stres koşullarında bakteriyel canlılığı korumak amacıyla başarıyla kullanılan ve son zamanlarda büyük ilgi uyandıran bir yaklaşımdır.

Bu tez çalışmasında enkapsüle edilen ve edilmeyen *Pediococcus pentosaceus* OZF suşunun adezyon ve immunmodölatör etkisinin *in vivo* koşullarda belirlenmesi amaçlanmıştır. Aynı suşun kullanıldığı kolit denemelerinin gerçekleştirildiği farklı bir çalışmada, OZF suşunun enkapsüle edilen ve edilmeyen formu farelere uygulanmış ve beslenmeyi takiben istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir immunmodölatör etki (IL-6, IL-1beta) tespit edilememiştir. Bundan dolayı çalışmaya farklı bir yön çizilmiş ve enkapsüle edilen ve edilmeyen OZF suşu ile beslemenin fare bağırsak mikrobiyal kompozisyonuna olan etkisi araştırılmıştır. Bununla beraber, suşu Gİ sistemden canlı olarak geçişi takip edilmiş ve bağısağa tutunma özelliğinin varlığı araştırılmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Probiyotikler

#### 2.1.1 Probiyotik tanımı ve tarihçesi

Probiyotik kelimesi Yunanca bir kelime olup; “yaşam için” anlamına gelmektedir. Lilly ve Stillwell (1965) probiyotik terimini, mikroorganizmalar tarafından üretilen büyüme destekleyici faktörler olarak tanımlamışlardır. Fuller (1989) ise probiyotikleri konukçunun bağırsak mikrobiyal kompozisyonuna olumlu etkileri olan canlı mikrobiyal gıda içerikleri olarak tanımlamıştır. Probiyotiklerin yaygın olarak kullanılan ve bilimsel olarak kabul gören günümüzdeki tanımı Gıda ve Tarım Teşkilatı (FDA, Food and Agriculture Organization; BM) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO, World Health Organization) tarafından yapılmıştır. Bu tanıma göre probiyotikler, uygun miktarda alındıkları zaman konakçı sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan canlı mikroorganizmalar dır (Anonymous).

Son zamanlarda bilimsel arenada artan bir ilgiye sahip olan probiyotiklerin tarihçesi oldukça uzun bir geçmişe dayanmaktadır. Probiyotikler ilk kez Pasteur Enstitüsü’nde Nobel ödüllü araştırmacı Metchnikoff’un çalışmaları neticesinde bilimsel bir anlam kazanmıştır. Metchnikoff (1907) Bulgar köylülerinin uzun ömürlü olduğunu gözlemlemiş ve bu durumu süt kullanımı ile ilişkilendirmiştir. Bu çalışmalar esnasında belli bakteri tüketiminin normal Gİ sistem mikroflorasında olumlu etkilere neden olabileceğini iddia etmiştir. Geleneksel yoğurt yapımında sütün fermentasyon işleminde kullanılan ve şimdiki ismiyle *Lactobacillus delbruckeii* subsp. *bulgaricus* olarak bilinen suşun kullanımıyla geliştirilen çalışmalar ilerleyen zamanlarda diğer bakteri izolatlarının kullanımına yönelik olarak ilerleme kaydetmiştir (Fernandes vd. 1987). Zamanla birçok farklı tür kullanılmaya başlanmıştır. Bunlar çoğunlukla laktik asit üreten bakterilerden *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium* cinslerine ait çeşitli türlerden oluşmaktadır. Aynı zamanda spor oluşturan bakterilerden *Bacillus* spp. türleri ve bazı maya türleride probiyotik olarak kullanılmaktadır.

Prebiyotikler ise konakta yararlı fizyolojik etkiler sergileyen mikroorganizmaların aktivitesini seçici olarak uyaran ya da gelişimine katkıda bulunan ve sindirilemeyen diyet gıda bileşenleridir (Gibson ve Roberfroid 1995). Bir gıda içeriğinin prebiyotik olarak sınıflandırılabilmesi için bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir. Herşeyden önemlisi, bir prebiyotik GI yolun üst kısmında absorbe edilememeli ya da parçalanmamalıdır. Kolonda bulunan potansiyel etkili bakteriler tarafından fermente edilebilmeli ve kolonik mikroflorayı daha sağlıklı bir populusyona dönüştürebilmelidir. Çoğu prebiyotik 2-9 şeker molekülü içeren (oligosakkarit) parçalanamayan zincirlerdir. Bu besin içerikleri vücuda alındıktan sonra küçük bağırsağı direk geçerek faydalı mikroorganizmalar tarafından kullanılmak üzere kolona ulaşmaktadırlar. Yüksek amilozlu mısırdan elde edilen nişasta ise özellikle probiyotiklerin GI sistem koşullarında canlılığını arttıran önemli bir prebiyotiktir. Nişasta özellikle kolondaki doğal bakteriler tarafından enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Gerçekleştirilen çalışmalar fruktooligosakkaritlerin özellikle *Bifidobacterium*'ların gelişimini indüklediğini göstermektedir (Bouhnik vd. 2004, Rossi vd. 2005). Prebiyotikler; probiyotiklerin kolondaki gelişimlerini indüklemenin dışında, konak sağlığı üzerine olumlu etkilerde sahip olabilirler. Örnek olarak, bazı prebiyotikler serum trigliseritlerini ve kolesterol seviyesini değiştirmekte (Davidson ve Maki 1999), kalın bağırsakta mineral emilimini desteklemekte (Roberfroid 2000) ve anti kanserojenik etkiler sergilemektedirler (Femia vd. 2002, Hsu vd. 2004).

Probiyotik ve prebiyotik bileşimi ise sinbiyotik olarak tanımlanmaktadır. Birçok çalışma sinbiyotik tüketiminin oral yoldan tek başına alınan probiyotik veya prebiyotiklere oranla daha fazla potansiyel tedavi edici rolü olduğunu göstermektedir. Gerçekleştirilen bir çalışmada; *Lb. acidophilus* ve frukto-oligosakkaritleri içeren sinbiyotik bir süt ürününün total serum kolesterolünü düşürücü etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Schaafsma vd. 1998). Kiebling vd. (2002) ise sağlıklı kadın gönüllerinde, uzun süreli sinbiyotik yoğurt (*Lb. acidophilus*, *B. longum* ve frukto-oligosakkarit içeren) tüketimine bağlı olarak LDL/HDL kolesterol seviyelerinin düzene girdiğini rapor etmişlerdir. Bununla beraber, düşük ağırlıktaki inülin ve LLG-*B. lactis* suşunu içeren sinbiyotik sıçanlara uygulanmış ve kolonik tümörde azalma meydana gelmiştir (Femia vd. 2002).

### 2.1.2 Probiyotiklerin seçim kriterleri ve muhtemel etki mekanizmaları

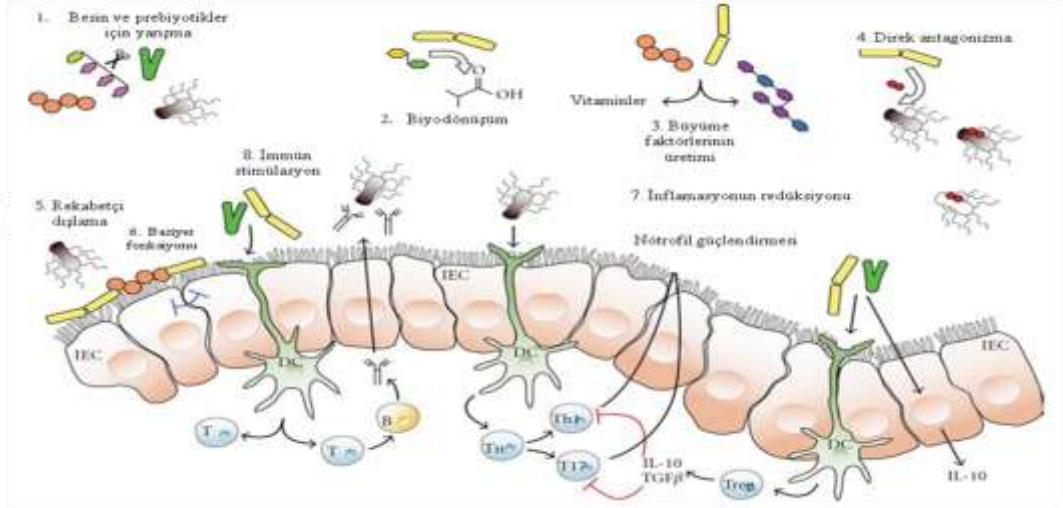
Konak üzerinde sağlık açısından olumlu etkiler sergileyen mikroorganizmalar olan probiyotikler, sağlıklı Gİ sistem dengesinin sürdürülebilmesi amacıyla yıllardan beri kullanılmaktadır. Gıda bileşeni olarak probiyotiklerin uygulama açısından düzenleyici etkileri şu anda uluslararası bir temel üzerine kurulmuş değildir. Bununla beraber probiyotik olarak kullanımla ilgili LABIP (laktik asit bakterileri endüstriyel platformu) tarafından belirtilen bazı zorunlu kriterler bulunmakta ve probiyotik takviye seçimlerinde birçok özellik ve karakteristik göz önünde bulundurulmaktadır (Ewaschuk ve Dieleman 2006). İyi bir probiyotiğin sağlaması gereken özelliklerin başında (i) hücrelere (özellikle bağırsak epitelyum hücrelerine) tutunabilme ve kolonize olabilme (ii) patojenik tutunmayı engelleme ya da azaltma, (iii) patojen gelişimini engelleyebilecek bakteriyosin, hidrojen peroksit ya da asit üretme, (iv) patojen, kanserojen veya invazif olmama, (v) son derece güvenli olma, (vi) normal doğal flora üyeleri ile koagre olabilme gibi temel özellikler gelmektedir (Indu vd. 2002). Potansiyel probiyotik suşların özellikle insan kaynaklı izolatlar olması, uluslararası kabul görmüş teknikler ile tanımlanması ve kültür koleksiyonlarına kayıt edilmesi gerekmektedir. Probiyotiklerin etkili olabilmesi için seçimlerinde göz önünde bulundurulması gereken en önemli kriter ise kullanılacak suşun büyük ölçekte canlı formlarda hazırlanabilmesi ve GI sisteme gelene kadar karşılaşılan koşullar altında canlılığını devam ettirebilmesidir. Kullanılacak suş saklama ve kullanılma sürecinde canlılığını ve dayanıklılığını devam ettirebilmeli, intestinal ekosisteme canlı olarak ulaşabilmeli ve konak üzerinde olumlu etkiler sergileyebilmelidir. Probiyotik bir kültürün özellikle mide asiti ve safra tuzu gibi birçok fiziksel ve kimyasal bariyere dirençli olması tercih edilmektedir. Bundan dolayı, laktik asit bakterilerinin doğal asit toleransı, gastrik yolda yaşayabilme kabiliyetleri, insan tüketimi sırasındaki güvenilirlik kayıtları, hedef lokasyonlara ve dokulara etkili olarak ulaşmaları evrensel probiyotik kriterler açısından oldukça önemli kabul edilmektedir.

Probiyotikleri içeren ürünlerin tüketimi tüm dünyada gün geçtikçe hızla artmakta ve probiyotikler genel olarak güvenli (GRAS) kabul edilmektedirler (Gupta ve Garg 2009). Bununla beraber, Snyderman (2008) probiyotiklerin güvenliği ile ilgili olarak kaygılarını

3 temel teoride birleştirmiştir. Bunlardan birincisi bakteriyemi, sepsis veya endokardit nedeniyle hastalıkların ortaya çıkabilmesi, ikincisi Gİ sistem üzerinde toksik veya metabolik etkilerin oluşabilmesi, üçüncüsü ise Gİ sistem florasına antibiyotik dirençliliğinin transfer olabilesidir. Ancak, saprofitik probiyotiklerin kullanımına bağlı olarak bakteriyemi veya fungemi ile ilgili az sayıda olgu olduğunu, bununla beraber epidemiyolojik araştırmalardan ve klinik bulgulardan elde edilen veriler neticesinde probiyotiklerin güvenle kullanılabileceklerini belirtmiştir. Wassenaar ve Klein (2008) ise probiyotik formülasyonunda kullanılan mikroorganizmaların güvenilir kabul edilmelerine rağmen bazı sorunların olabileceğini vurgulamışlar ve virülens faktörlere dikkat çekmişlerdir. Yatay gen transferi neticesinde virülens genler ya da antibiyotik dirençlilik genleri diğer bakteri popülasyonlarına aktarılabilmekte ve bu istenmeyen özellikler hızla yayılabilmektedir. Bundan dolayı kullanılacak suşun aktarılabilir dirençlilik genlerine sahip olmaması aranan başlıca kriterler arasındadır.

Günümüzde probiyotiklerin etki mekanizmalarını nasıl gerçekleştirdikleri halen bir tartışma konusudur. Gelişimsel olarak olgunlaşmamış bağırsak epiteli ile immün sistemi baskılanmış yenidoğan konakçılarında canlı probiyotik bakteri uygulamalarını içeren denemeler gerçekleştirilmekte ve probiyotik eylemin altında yatan mekanizmalar anlaşılmaya çalışılmaktadır (Oelschlaeger 2010). Probiyotiklerin muhtemel etki mekanizmaları Şekil 2.1’de şematize edilmiştir. Çok sayıda çalışma, Gİ sistemde probiyotiklerin özellikle bağlanma reseptörleri için yarışması sonucunda fırsatçı mikroorganizmaların kolonizasyonunu azalttıklarını, immün sistemi düzenlediklerini ve bazı aktif antimikrobiyal bileşenler ürettiklerini göstermektedir. Özellikle *Lactobacillus* türlerinin laktik asit üreterek pH düşüşüne neden olması Gram-negatif patojenik bakterilerin inhibiyonuna neden olmaktadır (Vanderberg vd. 1993). Ayrıca probiyotikler hücresel ve humoral cevapta rol alan birçok immunomodülatör etkiye sahiptirler. Belirli LAB suşlarının immün sistem üzerindeki etkileri NF-kappaB’nin transkripsiyonu, pro ve anti-inflamatör sitokinlerin indüksiyonu, dendritik hücrelerin olgunlaşmasının indüklenmesi, oral ya da sistematik uygulanan antijenlere karşı serum antikor yanıtının oluşturulması, dalak hücrelerinin ve fagositlerin immün reaktivitesinin kuvvetlendirilmesi şeklinde özetlenebilir (Ljungh ve Wadström 2006). İnsan kaynaklı bir izolat olan *Lb. rhamnosus* GG klinik olarak en iyi çalışılan probiyotik suş olmasına

rağmen olumlu etkileri üzerindeki temel mekanizmalar halen tam olarak anlaşılamamıştır. Ayrıca halen fizyolojisi ve genetiği ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.



Şekil 2.1 Probiyotiklerin muhtemel etki mekanizmalarının şematik sunumu

([http://www.customprobiotics.com/about\\_probiotics\\_continued.htm](http://www.customprobiotics.com/about_probiotics_continued.htm))

### 2.1.3 Probiyotiklerin tıbbi amaçlı kullanım alanları

Probiyotikler, belirli miktarlarda tüketildiği takdirde endojen mikrofloranın özelliklerini geliştirerek konakçı sağlığını olumlu yönde etkileyen canlı mikroorganizmalardır. Probiyotiklerin sağlığa faydalı bazı etkileri ve bu etkilerin muhtemel mekanizmaları çizelge 2.1’de özetlenmiştir. Uygulamaların en başarılı olduğu alanların başında bağırsak bariyer işlevinin bozulması ile ilişkili Gİ sistem rahatsızlıkları gelmektedir. Giderek artan klinik ve deneysel çalışmalar bağırsak lümeninde var olan flora bileşenlerinin alerjik ve inflamatuvar barsak hastalıklarında immunolojik yanıtı yönetmekte olduğunu göstermektedir (Bhadoria ve Mahapatra 2011). Probiyotik suşların Crohn ve irritabl bağırsak sendromu gibi hastalıkların semptomlarının hafifletilmesine, özellikle immun cevabı uyarak yardımcı olduğuna dair çalışmalar dikkat çekmektedir. Deneysel kolit modellerinde farklı probiyotik suşlar ve bunların birlikte kullanımı neticesinde başarılı veriler elde edilmiştir (Fujimori vd. 2007, Mack 2011).

Çizelge 2.1 Probiyotiklerin bazı olumlu etkileri ve muhtemel mekanizmaları

| Sağlığa faydalı etkileri                                                | Öne sürülen mekanizma(lar)                                                                                                                                                                                                                                           |
|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Laktoz intoleransının hafifletilmesi                                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>Bakteriyel galaktosidazın laktoz üzerine etki etmesi (Marteau vd. 1990)</li> </ul>                                                                                                                                            |
| Bağırsak florası üzerine olumlu etki                                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>Toksik metabolit üretiminin azaltılması</li> <li>Antibakteriyal etki (Gionchetti vd. 2000, Kruis vd. 2004)</li> </ul>                                                                                                         |
| İntestinal sistem enfeksiyonlarının engellenmesi                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>Sistemik veya salgısal immun cevap stimülasyonu</li> <li>Bağırsak koşullarının patojenlerin yaşamasına imkan vermeyecek şekilde değiştirilmesi (düşük pH, kısa zincirli yağ asitleri, bakteriyosin üretimi)</li> </ul>        |
| Diyare (rotavirüs, seyahat, antibiyotik ilişkili, <i>C. difficile</i> ) | <ul style="list-style-type: none"> <li>Agregasyon ve koagregasyon yetenekleri</li> <li>İntestinal mukozaya yapışmak suretiyle patojenlerin yapışmasının engellenmesi</li> <li>Besinler için rekabet (McFarland 2006, Szawal vd. 2006, Szajewska vd. 2006)</li> </ul> |
| İmmün sistemin güçlendirilmesi                                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>Beyaz kan hücrelerinin fagositik aktivitelerinin artırılması</li> <li>IgA üretiminin artırılması</li> <li>İntra-epitel lenfositlerin çoğaltılması (Isolaurei vd. 2001, Gill ve Guerner 2004)</li> </ul>                       |
| İltihabi veya alerjik reaksiyonların azaltılması                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>Bağışıklık sisteminin dengesinin yeniden düzenlenmesi</li> <li>Sitokin sentezinin düzenlenmesi (Kalliomaki vd. 2001, Viljanen vd. 2005)</li> </ul>                                                                            |
| Kolon kanseri riskinin azaltılması                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>Mutajen bağlama</li> <li>Karsinogenlerin inaktif hale getirilmesi (Ishikawa vd. 2005)</li> </ul>                                                                                                                              |
| Ürogenital enfeksiyonlar, antifungal aktivite                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>Üriner ve vajinal kanal hücrelerine yapışma</li> <li>İnhibitör maddelerin üretimi (<math>H_2O_2</math> gibi) (Anukam vd. 2006 a, b)</li> </ul>                                                                                |
| <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonu                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Laktik asit üretimi</li> <li><i>Helicobacter pylori</i>’nin üreaz aktivitesinin azaltılması (Sheu vd. 2006)</li> </ul>                                                                                                        |

Çizelge 2.1 Probiyotiklerin bazı olumlu etkileri ve muhtemel mekanizmaları (devam)

| Sağlığa faydalı etkileri                                            | Öne sürülen mekanizma(lar)                                                                                                                                                        |
|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kan lipitlerinin düşürülmesi ve kalp hastalığı riskinin azaltılması | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Kolesterol asimilasyonu</li> <li>▪ Safra tuzu hidrolaz enzim aktivitesi (Hlivak vd. 2005, Jauhiainen vd. 2005)</li> </ul>                |
| Diş hastalıkları                                                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>P. gingivalis</i>, <i>Fusobacterium nucleatum</i> &amp; <i>Sterptococcus</i> spp. 'ye karşı inhibitör etki (Nase vd. 2001)</li> </ul> |
| .....                                                               |                                                                                                                                                                                   |

Son yıllarda probiyotiklerin enfeksiyonlara karşı etkinliğine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. *Helicobacter pylori* ise bu araştırmaların büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Gerçekleştirilen çalışmalar probiyotik suşların *H. pylori* gelişimini inhibe ettiğini göstermektedir (Vitor ve Vale 2010, Wilhelm vd. 2011). *H. pylori* enfeksiyonu midedeki Smad7 ve NFkappaB ifadesini tetiklemekte, probiyotikler ise bu metabolik yolu engelleyerek *H. pylori*'nin indüklediği inflamasyonu azaltmaktadır (Yang vd. 2012). Bununla beraber probiyotik suşların *Candida albicans* enfeksiyonlarını önlediğine ya da azalttığına dair çalışmalar da mevcuttur (Hasslöf vd. 2010). Özellikle vajinal sekresyondan izole edilen *Lactobacillus* suşlarının üretmiş oldukları yüksek miktardaki hidrojen peroksitin *C. albicans* üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Juarez-Tomas vd. 2011). İlaveten diş eti hastalıklarına neden olan mikroorganizmaların farklı mekanizmalar ile inhibisyonu ise probiyotiklerin ağız-diş tedavisinde kullanılabileceği fikrini ortaya koymuştur. Bu konuda yapılan çalışmalar henüz başlangıç aşamasında olmasına rağmen periodontal hastalıklar ve ağız kokusunun engellenmesi ile ilgili çalışmalar oldukça dikkat çekicidir (Darwazeh ve Darwazeh 2011). *Lb. salivarius* WB21 suşunu içeren tabletlerin kullanılması sonucunda subgingival plaklarda periodontal patojenlerde anlamlı bir şekilde azalma meydana gelmiştir (Mayanagi vd. 2009). Aynı suş ağız kokusundan şikayetçi hastalarda iki hafta sürecinde düzenli olarak denenmiş ve ağız kokusunda belirgin bir azalma tespit edilmiştir. *Lb. reuteri* suşunun ise gingival bakteri içeriğini azalttığı belirlenmiştir (Iwamoto vd. 2010).

Laktoz intoleransı ise günümüzde dünya çapında oldukça yaygın bir sorun olup bağırsak mukozasının bozulması neticesinde laktaz enziminin azalmasından kaynaklanan bir hastalıktır. Laktaz enzimi az olan insanlarda laktoz tüketimi ishal, şişkinlik, karın ağrısı ve mide gazı gibi semptomlara neden olmaktadır. Laktoz sindirilemediğinden dolayı ozmotik denge bozulmakta ve bakterilerin fermentasyonu sonucunda oluşan metabolitler neticesinde aşırı gaz ve şişkinlik oluşmaktadır. Probiyotiklerin kullanımı ile serbest kalan bakteriyel laktaz enzimi ise laktozu parçalamakta ve hastalığın tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır (Rolfe 2000). Laktozu sindiremeyen hastalarda probiyotik *Lb. casei* Shirota ve *B. breve* Yakult suşlarının 4 hafta süresince birlikte uygulanması neticesinde iyileşme kaydedilmiştir (Almeida vd. 2012). Bu olumlu etkiye ilaveten probiyotiklerin serum kolesterolünü düşürücü etkilerine yönelik araştırmalar da mevcuttur. Vücutta serbest kalan safra tuzlarının probiyotiklerce parçalanarak intestinal sistemden uzaklaştırılmasının kolesterol seviyesini düşürdüğü düşünülmektedir. Laktik asit üretimine bağlı olarak oluşan asidik ortam safra tuzları ile kolesterolün presipitasyonuna neden olabilmektedir (De Boever vd. 2000). Başka bir hipoteze göre ise probiyotikler safra tuzlarını serbest asitlere parçalamaktadır. Bu şekilde safra tuzları vücuttan atılmakta ve kolesterolden yeni safra asitlerinin sentezi neticesinde vücuttaki toplam kolesterol konsantrasyonu düşürülebilmektedir (Laurens-Hattingh ve Viljoen 2001).

Laktik asit bakterilerinin kardiovasküler hastalıklardan, gastrointestinal mukozadaki zararlı patojenlerin sebep olduğu enfeksiyonların ve alerjik hastalıkların engellenmesine kadar birçok durumda immün reaksiyonlarda önemli rol oynayan T-yardımcı (Th: T-helper) hücrelerini teşvik ederek olumlu etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Bhadoria ve Mahapatra 2011). Th-1 tarafından üretilen IFN- $\gamma$  ve IL-12 hücresel bağışıklığı uyarmakta; Th-2 tarafından üretilen IL-4 ise B lenfosit hücrelerinin farklılaşmasını ve immünoglobulin E (IgE) üretimini kuvvetlendirmektedir (Lucey vd. 1996). Probiyotik suşların Th-1 tip sitokinlerinin üretimini kuvvetlendirdiği ve Th-2 tip sitokinlerin düzeyini ise düşürdüğü rapor edilmiştir (Pervan vd. 2003, Makino vd. 2006). Probiyotiklerin özellikle besin ve polen alerjisine karşı elde edilmiş başarılı sonuçları da bulunmaktadır. Özellikle IgE ve IL-4 üretiminin baskılanması alerji tedavilerinde oldukça önemli kabul edilmektedir (Repa vd. 2004). Balb/C soyu farelerde

gerçekleştirilen 3 farklı alerji grubuna ait çalışmada probiyotik *Lb. paracasei* suşunun inflamasyonu azalttığı ve alerji tedavilerinde potansiyel oluşturabileceği belirtilmiştir. Bununla beraber, süt ve süt ürünlerinin fermentasyonu için kullanılan çeşitli laktik asit bakteri suşlarının bazı kanser türlerini azalttığını ve tümör büyümesini inhibe ettiğini gösteren epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar, bu kültürlerin antimutajenik ve antikarsinojenik özelliklere sahip olduğunu desteklemektedir (Cousin vd. 2012, Zhang vd. 2012).

Toplumda artan sağlık sorunları, hastalıklar için harcanan para, ilerleyen yaşlarda da sağlıklı kalabilme isteği, bilim ve teknolojik araştırmalar günümüz insanını bilinçlendirmiştir. Artan sağlık bilinciyle fonksiyonel ürünlere yönelik talep ise artmıştır. Probiyotik ürün; içerisinde konakçı sağlığı üzerine olumlu etkileri olan mikroorganizmaları içeren veya çeşitli bileşenler ile desteklenerek sinbiyotik olarak üretilen kapsül veya tablet şeklindeki diyet destekleyicilerdir. Probiyotikler eczanelerde yoğunlaştırılmış olarak ilaç formunda toz veya kapsül şeklinde satılmaktadır. Bu preparatların özellikle kabızlık ve antibiyotik tedavisi sonucu ortaya çıkan diyare gibi GI düzensizliklerin önlenmesinde sıklıkla kullanıldığı bilinmektedir. Probiyotiklerin sağlık üzerine olumlu etkilerine her geçen gün bir yenisi eklenmektedir. Bununla beraber probiyotikler kesinlikle herhangi bir ilaç yerine kullanılmamalı, sadece sağlık destekleyici ürünler olarak tüketiciye alternatif olarak önerilmektedirler. Eğer bir probiyotik besin takviyesi kullanımı düşünülüyorsa öncelikle doktora danışılmalıdır.

#### **2.1.4 Fonksiyonel gıdalar**

Bağırsak mikrobiyal flora kompozisyonunda modülasyonun bir çeşiti de probiyotik olarak canlı mikrobiyal diyet bileşenlerinin kullanılmasıdır. Fonksiyonel gıdalar son yıllarda hayatımızın önemli bir parçasını oluşturmaktadır. İnsanlar artık metabolizmaya yararlı ve hastalıklardan korunmaya yardımcı fonksiyonel gıdalara yönelmektedirler. Son yıllarda artan bu ilgi, lisanslı yeni probiyotik/sinbiyotik ürünlerin geliştirilmesini içeren çalışmalarda hızlı bir artışa neden olmuştur. Sağlıklı beslenme eğilimi doğrultusunda, konak üzerinde olumlu etkiler sergileyen ve buna bağlı olarak dünyada yıldızı parlayan fonksiyonel gıda pazarı hızla büyürken, firmalar farklı alanlardaki

ürünleri ile pazarlarını büyütmektedirler. Geleceğin gıda akımı olarak gösterilen fonksiyonel gıdalar dünyada 50 milyar euro'luk bir pazar oluşturmaktadır. Probiyotik takviyelerin küresel satışları geçtiğimiz yıl yüzde 48 artışla 27 milyar dolara ulaşmıştır. 2016 yılında ise bu rakamın 42 milyar dolara yükselmesi beklenmektedir. Probiyotik takviyelerdeki bu hızlı gelişim, gıda alanındaki iş hacmini de ciddi oranda etkilemektedir. Türkiye'deki fonksiyonel gıda pazarı ise gelişime açık ve dinamik yapısıyla yabancı şirketlerin ilgi odağı olmuştur. Türkiye'nin probiyotik açılımı, yaklaşık 8 yıl önce özellikle bağırsak tembelliğine çözüm olarak reklamı yapılan ve piyasaya sunulan yoğurtlarla başlamıştır. Probiyotik yoğurtların ilk yıl içinde elde ettikleri başarılı pazar, probiyotik bakterilerinin yoğurt ve yoğurt içecekleri dışındaki ürünlere de ilavesi için büyük bir açılıma neden olmuştur. Türkiye pazarında 5 yılda iki kat büyümesi beklenen probiyotik ürünler, bebek mamalarından ekmeğe, dondurmadan yoğurda kadar beslenme alışkanlıklarının neredeyse tümüne girmiştir. Türkiye'de probiyotik süt ürünleri pazarında şu anda beş firma (Danone, Süttaş, Pınar, Ülker ve Nestle) çeşitli ürünleriyle faaliyet göstermektedirler. Pazarın potansiyeli bu kadar yüksek olunca, şirketler de yatırım ve ürün geliştirme konusunda birbiriyle yarışmaktadırlar. Danone Paris'deki araştırma-geliştirme merkezinde, bilim adamlarının raporlarıyla destek verdiği ve bilimsel kurumlardan onay alan birçok probiyotik bakteriyi tanımlamış ve ürünlerinde dahil etmiştir. Fonksiyonel gıda üretimine başlayan Ülker ise, İsviçreli Hero Şirketi ile AktiPro ve AktaVitale markaları altında 4 yeni ürünü piyasaya sunmuştur. Dondurma pazarına pek çok ürün sunan Algida-Max markası ise 2008 yılında ürün çeşitliliğine Probiyotik Dondurma'yı eklemiştir. Bu gelişmeler, dünya devlerinin yeni yatırımlarını bu alana yönlendirdiğini göstermektedir.

Sağlık açısından faydalı olabilmesi amacıyla, ürün için belirlenen ve önerilen probiyotik konsantrasyonu ve uygulamaları çeşitlilik göstermektedir (Shah 2000). Oral yoldan tüketilen probiyotiklerin sağlık üzerinde olumlu etkiler sergileyebilmesi için gıdada bulunması gereken minimum dozu  $10^6$  kob/ml'dir. Günlük alım dozu ise  $10^8$ - $10^9$  kob/ml olarak değişmektedir (Boylston vd. 2004). Marketlerde ve pazara sunulan probiyotik ürünlerde karşılaşılan en büyük problem probiyotik suşların ürün oluşum ve saklama sürecinde düşük canlılık sergilemeleridir (Shah vd. 1995). Bakteriler tarafından üretilen hidrojen peroksit ve asit, ürünlerdeki oksijen konsantrasyonu, paketteki oksijen

geçirgenliği gibi birçok faktörün fermente gıdalar içerisindeki probiyotik bakterilerin canlılığını etkileyebilmektedir (Shah 2000). Araştırmacılar, bu soruna çözüm olarak enkapsülasyon tekniğini önermektedirler.

## 2.2 Enkapsülasyon

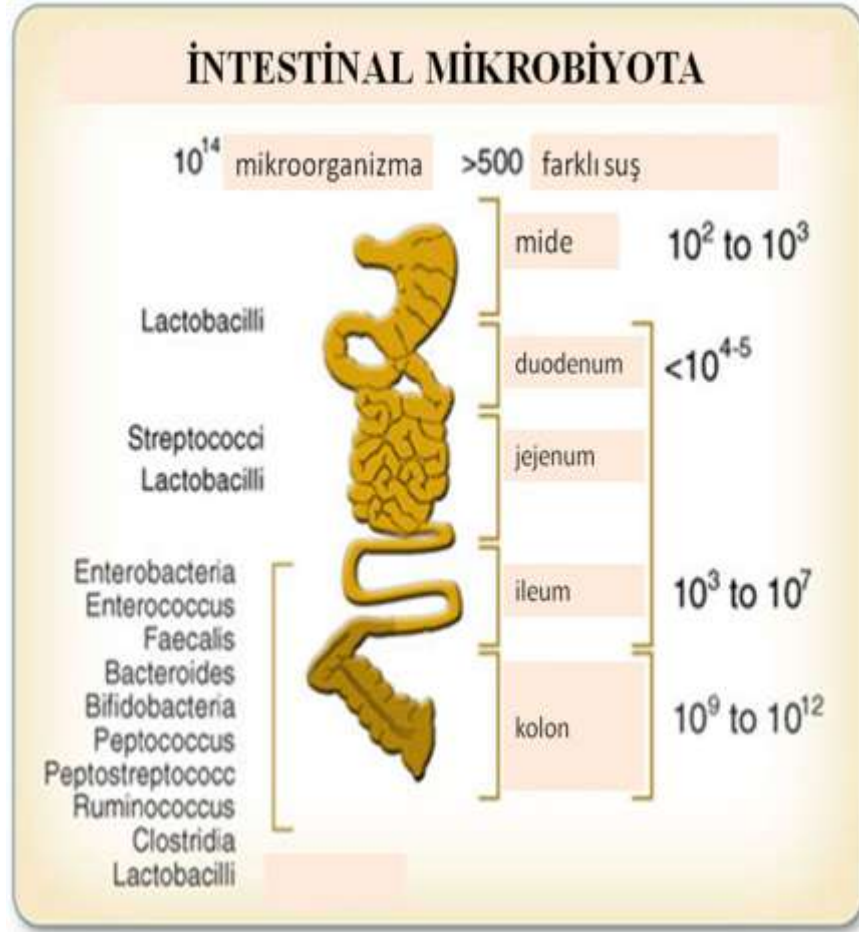
Enkapsülasyon, herhangi bir materyalin yararlı özelliklerini korumak amacıyla bir kaplama materyali içerisine paketlenip kapsül haline dönüştürülmesi işlemidir (Gharsallaoui vd. 2007). Tekniğin uygulanmasındaki temel amaç, kaplanan materyali stabilize etmek ve dış ortama transferini engellemektir. Enkapsülasyon, kapsüle materyalin hedef bölgede hem kontrollü hem de tam olarak salınımı için tasarlanabilmektedir. Boyutları 100-1000µm arasında değişen kapsüller mikrokapsül olarak tanımlanmaktadır (Uludag vd. 2000). Mikrokapsüller makrokapsüllere göre daha dayanıklıdır ve mekanik bozulmaları zordur. Biyoenkapsülasyon ile hedeflenen bölgeye iletim ise maksimum sayıda canlı probiyotik suşun konak intestinal sistemine ulaştırılması amacıyla oldukça ilgi gören bir yaklaşım olup biyoaktif materyalin mikrokapsüller içerisinde muhafaza yolu ile korunmasını içermektedir.

Enkapsülasyon amacıyla ekstrüzyon-emülsiyon, püskürterek dondurma ve soğutma, lipozom tutuklama ve ko-kristalizasyon gibi yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler içerisinde ekstrüzyon-emülsiyon (dripping, damlatma) tekniğinin probiyotik mikroorganizmaların canlılığını %80-95 oranında koruduğu belirtilmektedir (Krasaekoopt vd. 2004). Fakat her iki teknikte avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Her iki yöntemde de canlılığın korunma yüzdesi benzer olmasına karşılık emülsiyon yöntemi, tasarlanması daha zor, yüksek maliyette ve ekstrüzyon yöntemine kıyasla daha zor bir yöntemdir. Bununla beraber daha küçük çapta kapsül edilebilmektedir. Emülsiyon tekniği bitkisel yağların aljinat-kalsiyum karışımı ile kullanımından oluşan bir tekniktir (Krasaekoopt vd. 2004). Ekstrüzyon tekniğinde ise probiyotik suşu içeren sodyum aljinat solüsyonu direk olarak şırınga ya da cihaz yardımıyla kalsiyum klorür çözeltisine damlatılmakta ve hızlı bir şekilde kapsüller elde edilmektedir. Canlı probiyotiklerin oral yoldan alınması ve hedef bölgeye canlı olarak ulaşabilmesi amacıyla aljinat (Truelstrup-Hansen vd. 2002), jelatin (Hyndman vd. 1993), karrageenan (Hunik veTramper 1993),

selüloz (Rao vd. 1989), gellanksanthan (Sun ve Griffiths 2000), peynir altı tozu proteinleri (Picot ve Lacroix 2003), nişasta (O’Riordan vd. 2001) gibi farklı kaplama materyalleri kullanılabilir. Uygun polimerler arasında kalsiyum-aljinat boncuk kombinasyonu probiyotik bakterilerin immobilizasyonunda sıklıkla kullanılır. Aljinat enkapsülasyonu oldukça düşük maliyette, kolay gerçekleştirilebilen, cihaz bağımsız ve biyolojik olarak uyumlu bir tekniktir. Kalsiyum iyonları ile aljinatın oluşturduğu reaksiyonun geri dönüşülebilir olması ve insan kolonunda serbest olarak açılabilmesi ise diğer önemli avantajlarıdır. Bunlarında ötesinde, aljinat toksik değildir ve gıda katkısı olarak kullanımı onay almıştır (Sheu ve Marshall 1993).

### 2.3 Mikrobiyota

Yetişkin bir insanın yaklaşık 25-35 metre uzunluğundaki Gİ sistemi, oldukça fazla sayıda (yaklaşık 2 kg ağırlığa denk  $10^{14}$  mikrobiyal hücre) ve çeşitlilikte (>1000 tür) olağanüstü bir mikrobiyal nüfusa ev sahipliği yapmaktadır (Şekil 2.2) (Quin vd. 2010). Bu populasyon insan vücudundaki toplam hücre sayısının yaklaşık 10 katı olup bağırsak florası olarak tanımlanmaktadır. Anaerobik flora *Bacteroides* spp., bifidobakteriler, propionibakterilerce baskın olmasına rağmen enterobakterler ve enterokoklarda çoğunluktadır. Kolondaki yararlı mikrofloranın yaklaşık %90’ı bifidobakterilerden oluşmaktadır. Laktobasillerin kompozisyonu ise oldukça fazla olmasına rağmen bifidobakterilerden azdır.



Şekil 2.2 İntestinal mikrobiyota içeriğinin şematik görünümü

[http://www.customprobiotics.com/about\\_probiotics\\_continued.htm](http://www.customprobiotics.com/about_probiotics_continued.htm)

Bu yoğun ve kompleks mikrofloradan dolayı, fonksiyonel olarak da oldukça aktif bir bölge olan insan kolonu metabolik olarak vücudun en aktif organı olarak tanımlanmaktadır. Bu yerleşik flora hem yararlı hem de zararlı olabilecek çeşitli fonksiyonları yerine getiren oldukça aktif bir topluluktur (Dunne vd. 2001). Genellikle bu yararlı ve zararlı bakteriler arasında bir rekabet mevcuttur. Mevcut olan hassas, fakat kritik dengeyi yalnızca bağırsak sisteminin sağlığının devamında değil bireyin genel sağlığında da önemli bir rol oynayan muazzam bir bakteriyel populasyon sürdürmektedir. Mevcut mikrofloranın kompozisyonu bireyler arasında hatta aynı bireyde farklı zaman aralıklarında farklı olabilmektedir. Beslenme koşulları başta olmak üzere, iklim, yaşlanma, ilaçlar, hastalık, stres, pH, enfeksiyon, coğrafi konum, ırk, sosyoekonomik koşullar, yaşam tarzı gibi birçok faktör bu dengeyi bozabilmektedir. Bu

durum bağırsak florasının metabolik faaliyetlerini, kolonizasyonunu ve değişiklere karşı direncini de etkilemekte ve hastalıklara neden olan bakterilerin kolonizasyonunda artışa neden olmaktadır (Percival 1997). Dengesiz yerel bağırsak mikrobiyal florasının özelliklerinin düzeltilmesi ise probiyotik yaklaşımın gerekçesini oluşturmaktadır. Probiyotik olarak bilinen canlı mikrobiyal diyet bileşenlerinin kullanılması bağırsak mikrobiyal flora kompozisyonunun düzenlenmesinde oldukça önemlidir. Özellikle son zamanlarda bağırsak florasının insan hastalıklarında birincil role sahip olduğu öne sürülmekte, probiyotiklerin ise bağırsak olgunlaşması ve dengesi için gerekli temel bakteri suşlarının kaynağı olabileceği düşünülmektedir (Khani vd. 2012).

Mide-bağırsak sisteminin fonksiyonu ve durumu konağın sağlıklı olabilmesi için oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Bağırsak mikrobiyotası konakçı beslenmesinden elde edilen besinlerin parçalanmasında, konakçının yağ depolanmasının düzenlenmesinde, bağırsak epitelinin yenilenmesinin uyarılmasında ve direk olarak immun sistemin olgunlaşmasının kontrolünde önemli rol oynamaktadır (Stearns vd. 2011). Birçok faktör kolonik mikrobiyotanın kompozisyonunu ve metabolik aktivitesini etkilemektedir (Matsumoto vd. 2012). Birçok hastalık ise bağırsak mikrobiyotasının bu olağanüstü dengesinin bozulması sonucu meydana gelmektedir. Bu hastalıkların başında, *Clostridium difficile* patojenine olana hassasiyetin artması, Crohn ve ülseratif kolit gibi kronik hastalıklar, akut gastroenteritis, gıda hipersensitivitesi, alejik reaksiyonlar ve kolon kanseri gelmektedir (Molloy vd. 2012). Hasta ve sağlıklı konak ile mevcut mikrobiyotanın etkileşimi anlamak hastalıkla mücadele adına önemli bilgiler sağlayabilmektedir. Bağırsaktaki mikrobiyal türlerin çoğunluğu henüz kültüre edilememiş olsada, yüksek miktarda çeşitlilik ve işlevsellik analizi için kültür bağımsız yaklaşımların uygulanması sağlıklı ve hastada mevcut olan mikrobial çeşitliliğin karakterizasyonuna olanak sağlamaktadır. Probiyotiklerin diyet bileşeni olarak tüketimi ise mikrobiyotayı güçlendirebilmekte ve değiştirebilmektedir (Gourbeyre vd. 2011).

Probiyotikler bağırsak mikrobiyal metabolizmasını düzenleyerek konak üzerinde birçok olumlu etkiye sahiptirler. Son zamanlarda elde edilen bilimsel kanıtlar probiyotiklerin enterik mikrobiyotanın dengesinin ve istikrarın sağlanmasında gastrointestinal fonksiyonları değiştirerek (Gİ geçiş süresinin kontrolü, besin

biyoyararlanımı, bağırsak alışkanlıkları, Gİ immun aktivitenin modülasyonu gibi) önemli rol oynadığını ortaya koymuştur (Bednorz vd. 2009, Ceapa vd. 2013). Doğum şekli, yaşam koşulları, hijyen, beslenme şekilleri, ilaç kullanımı başta olmak üzere bir çok etken mikrobiyal kompozisyon üzerinde etkili olmaktadır. Yeni gen dizi analizi teknolojilerinin ve güçlü biyoinformatik araçlarının geliştirilmesi mikrobiyota kompozisyonlarının analizi için önemli bakış açıları sunmaktadır. İnsanlarda normal-sağlıklı bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun karakteristiğinin net bir tanımı henüz tamamlanmamıştır. Ancak inflamatuvar bağırsak hastalıkları başta olmak üzere, obezite ve bazı metabolik sendromları içeren birçok sağlık sorununun fekal flora kompozisyonunun ve intestinal mukozal komünitenin değişmesi ile ilişkili olduğu bilinmektedir. İnflamatuvar bağırsak hastalığına sahip bireylerin bağırsak mikrobiyota kompozisyonu sağlıklı gruplardan farklı bulunmuştur. Örneğin, Crohn hastalarının mikrobiyal kompozisyonu *Faecalibacterium prausnitzii* türünde meydana gelen azalma ile karakterize edilmiştir. İlaveten Proteobakteri ve Aktinobakteri filumlarında artış tespit edilmiştir (Frank vd. 2007, Sokol vd. 2008). Atopi gibi otoimmünite ile ilişkili sorunlarda yine aynı şekilde bağırsak mikrobiyal kolonizasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Birçok moleküler çalışma atopik egzemalı ve sağlıklı çocukların farklı bağırsak mikrobiyal ekosistemine sahip olduğunu göstermiştir. Bu duruma neden olabilecek çeşitli mekanizmalar olabileceği düşünülmektedir. Hipotezlerden biri ise sezeryan ile doğan çocukların bağırsaklarının anne cildinden değil hastane ortamından kaynaklanan bakteriler ile kolonize olmaları olarak açıklanmıştır (Van Nimwegen vd. 2011). Penders vd. (2007) *E. coli* ile erken kolonizasyonun egzema riskini, alerjik duyarlılığı ve *Clostridium difficile* kolonizasyonunu arttırdığını rapor etmişlerdir. İlaveten antibiyotik kullanımı, beslenme şekli, hijyen gibi çevresel koşullar da risk faktörleri olarak gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar mikrobiyota ve beyin ekseninde de bir ilişkinin olduğunu göstermektedir. Otizm, sosyal etkileşimin ve iletişimin sınırlı olduğu sinirsel gelişim bozukluğu ile karakterize edilen bir hastalıktır. Belirtiler 3 yaşından önce meydana gelmektedir. Bazı kanıtlar, otistik hastaların fekal mikrobiyal kompozisyonda özellikle *Clostridium* alttiplerinde artışa yönelik bazı değişiklikler olduğunu göstermektedir (Song vd. 2004, Finegold vd. 2010). Aynı çalışmalarda absorbe olmayan antibiyotiklerin belirtileri ciddi bir şekilde arttırdığı tespit edilmiştir.

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1 Materyal**

##### **3.1.1 Bakteri kültürleri ve gelişme koşulları**

Bu çalışmada daha önceki çalışmalarımızda anne sütünden izole edilen, tür düzeyinde moleküler tanısı 16S rRNA dizi analizi kullanılarak gerçekleştirilen ve evrensel probiyotik kriterlere sahip olduğu belirlenen, bakteriyosin üreticisi *Pediococcus pentosaceus* OZF suşu (NCBI Aksesyon numarası: HM051378) kullanılmıştır (Osmanagaoglu vd. 2010, 2011, 2013). Man Rogosa Sharpe (MRS) besiyerinde 37°C’de 18 saat geliştirilen kültür % 50’lik gliserol çözeltisinde -80°C’de saklanmıştır. OZF suşuna özgü antibiyotikli seçici besiyeri, MRS besiyerine 10 µg/ml kanamisin, 10 µg/ml vankomisin ve 1 µg/ml amfisilin eklenerek oluşturulmuştur.

##### **3.1.2 Deney hayvanlarının temini**

Çalışma kapsamında kullanılan yaklaşık 8 haftalık erkek Balb/C soyu fareler, Bordeaux Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi’nden (Fransa) temin edilmiştir ve bu merkezde barındırılmıştır. Deney hayvanlarının barındırıldıkları odanın ısısı klima yardımı ile 22±2°C, nem oranı ise %40-60 oranında olacak şekilde sabit tutulmuştur. Odanın camları ışık geçirmeyecek şekilde olup aydınlık-karanlık döngüsü otomatik olarak denetleyici bir cihaz ile 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmıştır. Deney hayvanları için kullanılan yemler özel olarak deney hayvanları için üretilmekte olup deneklere herhangi bir kısıtlama olmadan verilmiştir. Su ihtiyaçları için yine herhangi bir kısıtlama olmadan steril çeşme suyu kullanılmıştır. 1 haftalık ortama alışma sürecinin ardından fareler 4 gruba ayrılmışlardır (n=5).

### **3.1.3 Çözelti ve malzemelerin sterilizasyonu**

Çalışma süresince kullanılan tüm cam malzemelerin sterilizasyonu için pastör fırını (175°C’de 1 saat); tampon, çözelti ve besiyerlerinin sterilizasyonu için ise otoklav kullanılmıştır (121°C’de 15 dakika).

### **3.1.4 Moleküler markörler**

Bu çalışmada kullanılan moleküler markörler EK 1’de verilmiştir.

### **3.1.5 Besiyerleri ve Tamponlar**

Bu çalışmada kullanılan besiyerleri ve tamponların kompozisyonu ve hazırlanışları EK 2’de verilmiştir.

### **3.1.6 Kimyasallar**

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar, içerikleri ve temin edildikleri firmalar EK 3’de verilmiştir.

## **3.2 Yöntem**

### **3.2.1 Enkapsülasyon**

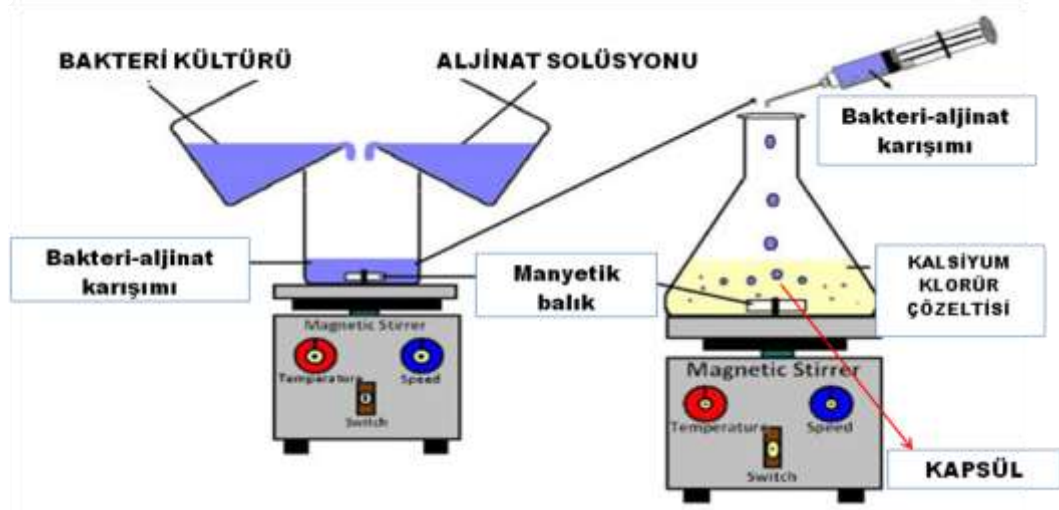
#### **3.2.1.1 Bakteri kültürün hazırlanması**

*Pediococcus pentosaceus* OZF suşu 100ml MRS besiyerine %1 oranında inoküle edilmiş ve 37°C’de 18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 10.000g’de 10 dakika santrifüj edilmiş (4°C) ve elde edilen pellet 2 kez PBS (phosphate buffered saline) tamponu ile yıkandıktan sonra, son konsantrasyonu  $10^{8-9}$  kob/ml olacak şekilde kapsülasyon çalışmalarına dahil edilmiştir.

### 3.2.1.2 Enkapsülasyon işlemi

Enkapsülasyon işlemi Gbassi vd. (2009) tarafından belirtilen yöntem üzerinde bazı modifikasyonlar yapılmak suretiyle gerçekleştirilmiştir. Kaplama materyali olarak ucuz, verimli ve gıda uyumlu olduğu bilinen düşük vizkositeye sahip **sodyum aljinat** (Sigma, 30 g/l) kullanılmış ve ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda yaklaşık 2 saat bekletilerek homojen hale getirilmiştir. Hücre süspansiyonu (yaklaşık  $10^9$  kob/ml) 10 ml kaplama materyali ile karıştırılmış ve mikrokapsüller bu karışımın bir şırınga yardımıyla (27G) 0.1M  $\text{CaCl}_2$  (pH:6.0) içeren solüsyona damlatılmasıyla oluşturulmuştur (Şekil 3.1). Bu işlem manyetik karıştırıcı üzerinde gerçekleştirilmiş ve jelleşmenin tamamlanması için yaklaşık 30 dakika bekletilmiştir. Hazırlanan kapsüller bir sonraki aşamaya kadar 4°C’de %1.5 peptonlu su içerisinde saklanmıştır.

Çalışmanın ikinci aşamında double-enkapsülasyon yapılmış ve aljinat ile kapsüle edilen OZF suşu **peynir altı suyu proteinleri** kullanılarak ikinci bir kaplama işlemine tabi tutulmuştur. Kaplama işlemi, daha önce hazırlanan kapsüllerin 100 ml steril peynir altı suyu protein solüsyonunda (%5) bekletilmesi neticesinde gerçekleştirilmiştir. Bu işlem manyetik karıştırıcı üzerinde yapılmış (100 rpm) ve jelleşmenin tamamlanması için yaklaşık 30 dakika bekletilmiştir. Elde edilen kapsüller liyofilizasyon işlemine tabi tutulmuş ve kurutma işlemini takiben 4°C’de saklanmıştır.



Şekil 3.1 Enkapsülasyon işleminin şematik görünümü

### **3.2.1.3 Peynir altı suyu proteinlerinin sterilizasyonu**

%4' lük whey proteini tozu steril saf su içerisinde çözülmüş ve çözeltinin pH'sı 5M HCl ile pH:4,7 olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu işlemin ardından hazırlanan çözelti +4 °C'de 24 saat manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırılmıştır. Karıştırma işleminin bitiminde 25000 rpm'de 1 saat +4°C'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminin ardından çözeltinin pH' sı 5M NaOH ile pH: 7 olarak ayarlanmış ve 0,45 µm por çapına sahip filitreden geçirilerek sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.1.4 Liyofilizasyon**

Kapsüllenmiş probiyotikler liyofilize edildiklerinde düşük sıcaklıklarda ve durağan atmosferde (nitrojen ya da vakum) daha iyi depolama stabilitelerine sahiplerdir (Zuidam ve Nedovic 2010). -80°C'de dondurulan OZF içeren kapsüller liyofilizasyon cihazında (Heto Powerdry LL3000) 0.05-0.1 bBar basınç ve yaklaşık -50°C sıcaklıkta 12 saat bekletilerek liyofilize edilmiştir.

### **3.2.2 Kapsül yapılarının taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri**

Liyofilize edilen kapsüller taramalı elektron mikroskobunda (SEM, FEI QUANTA 200F) incelenmeden önce altın kaplama işlemine tabi tutularak SEM'de incelenmişlerdir (Gatan 682PECS, *Gatan*, Inc. U.S.A.). Çalışma Bilkent Üniversitesi Malzeme Bilimi ve Nanoteknoloji Enstitüsünde (UNAM, Ankara) gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.3 Kapsüllerin depolama stabilitelerinin belirlenmesi**

Kapsüller 4°C'de 6 ay depolanmış, depolamanın başlangıcında ve ayda bir yapılan sayımlarla, kaplama materyallerinin, mikroorganizma canlılığı üzerine etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla belirli miktarda alınan (0.1g) kapsüller 10 ml 0,1M fosfat tamponunda (pH:7.0) homojenize edilmiş ve homojenizasyon sonrasında kültürel sayım yöntemi kullanılarak canlı bakteri sayıları kob/ml olarak hesaplanmıştır.

### **3.2.4 Kapsüllerin *in vitro* gastrointestinal sistem koşullarında dayanıklılıklarının belirlenmesi**

Optimize edilen parametrelere göre tasarlanan çift-katlı enkapsülasyonun *P. pentosaceus* OZF suşunun Gİ sistemde canlılığı üzerine etkisinin belirlenebilmesi amacıyla *in vitro* Gİ koşulları oluşturulmuş ve bu ortamlarda kapsüllerde canlı kalabilen bakteri sayıları belirlenmiştir. Bu aşamada, her hangi bir işleme tabi tutulmayan kapsüller ile kapsüle edilmemiş canlı OZF suşu kontrol olarak kullanılmıştır.

#### **3.2.4.1 Düşük pH değerlerine karşı dayanıklılıklarının belirlenmesi**

Kapsüllerin midenin yüksek asitli ortamından geçerek bağırsağa ulaşabilme yeteneğini belirlemek amacıyla mide sıvısı koşullarına benzer bir ortam oluşturulmuştur. Bu amaçla kapsüller 5M HCl ile pH 1.8, 3.0 ve 7. değerlerine ayarlanmış PBS tamponlarında 37°C’de shaker (100 rpm) üzerinde besinlerin midede kalma süresi dikkate alınarak 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyonun 0., 1. ve 3. saatlerinde örneklerden numuneler alınmış ve kapsüllerin açılmasını takiben seri seyreltme işlemi gerçekleştirilerek MRS katı besiyerine yayma ekimler yapılmıştır. 37°C’de 48 saat inkübasyonun ardından kontrol ve test gruplarındaki koloniler sayılarak, değerler log kob/mL olarak hesaplanmıştır (Maragkoudakis vd. 2006). Çalışmalar 2 bağımsız deneme şeklinde gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.4.2 Pepsine karşı dayanıklılıklarının belirlenmesi**

Kapsüllerin pepsine karşı direnç özelliğinin belirlenebilmesi ve gastrik koşulların oluşturulabilmesi amacıyla 3 mg/ml pepsin içeren pH 2.0 ve pH 3.0 değerinde hazırlanmış PBS tamponları kullanılmış ve yukarıda belirtilen işlemler tekrarlanmıştır (Maragkoudakis vd. 2006). Çalışmalar 2 bağımsız deneme şeklinde gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.4.3 Pankreatine karşı dayanıklılıklarının belirlenmesi**

Kapsüllerin pankreatine karşı direnç özelliğinin belirlenebilmesi amacıyla 1 mg/ml pankreatin içeren PBS tamponları kullanılmış ve 37°C’de 4 saat inkübasyonu takiben

yukarıda belirtilen işlemler tekrarlanmıştır (Maragkoudakis vd. 2006). Çalışmalar 2 bağımsız deneme şeklinde gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2.4.4 Safra tuzuna karşı dayanıklılıklarının belirlenmesi

Kapsüllerin safra tuzuna karşı direnç özelliğinin belirlenebilmesi amacıyla % 0.3, 0.5 ve 1 oranında safra tuzu içeren PBS tamponları kullanılmış ve 37°C’de 4 saat inkübasyonu takiben yukarıda belirtilen işlemler tekrarlanmıştır (Maragkoudakis vd. 2006). Çalışmalar 2 bağımsız deneme şeklinde gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2.5 *In vivo* çalışmalar

*In vivo* çalışmalar kapsamında kullanılan Balb/C soyu fareler 4 gruba (n=5) ayrılmış ve her bir grup farklı uygulamalara tabi tutulmuştur (Çizelge 3.1). Çizelge 3.1’de belirtilen uygulama şekilleri ve dozları intragastrik gavaj yardımı ile 2 hafta boyunca her gün düzenli bir şekilde gerçekleştirilmiştir. On beş gün süren besleme periyodunu takiben; deney ve kontrol grubuna ait farelere servikal dislokasyon ile ötanazi gerçekleştirilmiştir. Aseptik koşullarda intestinal bölgeleri (jejunum, ileum, proksimal kolon ve kör bağırsak) dikkatli bir şekilde ayrı ayrı alınmış ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere sıvı azotta -80°C’de saklanmıştır.

Çizelge 3.1 *In vivo* denemelerde kullanılan gruplar ve uygulama şekilleri

| Grup no (isim) | Uygulama şekli                                              |
|----------------|-------------------------------------------------------------|
| 1 (K)          | Sadece steril su (100 µl) (negatif kontrol)                 |
| 2 (BK)         | Boş kapsül (10 mg) (pozitif kontrol)                        |
| 3 (OZF)        | Kapsüle edilmemiş OZF suşu (100 µl; 10 <sup>8</sup> kob/ml) |
| 4 (OZF-K)      | OZF içeren liyofilize kapsül (10 mg)                        |

### 3.2.5.1 Kapsüle edilmiş *Pediococcus pentosaceus* OZF suşunun fare gastrointestinal sisteminden canlılığını koruyarak geçişinin belirlenmesi

Kapsüle edilmiş *P. pentosaceus* OZF suşunun *in vivo* koşullarda GI sistemden canlı olarak geçip geçemediğini gösterebilmek amacıyla fare fekal örnekleri kullanılmıştır. Dört grubun kullanıldığı çalışmada beslenmeden önce (0. saat) ve düzenli beslemeyi takiben belirli saatlerde (4, 6, 8, 10, 12, 14,16 ve 24 saat) farelerden toplanan fekal örnekler son hacim 100 mg/ml olacak şekilde steril serum fizyolojik (%0.85 NaCl) ile vortekslenerek homojen hale getirilmiştir. Homojenizasyonun ardından numune içerisinde var olması beklenen *P. pentosaceus* OZF suşunun tespiti hem mikrobiyolojik (antibiyotik dirençli varyantların belirlenmesi) hem de Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) çalışmaları ile belirlenmiştir. Mikrobiyolojik yöntemler dahilinde homojenize edilen fekal örnekler seri seyreltme işlemine tabi tutulmuştur. Seyreltme işlemi takiben OZF suşuna özgü antibiyotikli seçici besiyerine (10 µg/ml kanamisin, 10 µg/ml vankomisin, 1 µg/ml amfisilin) yayma ekimler yapılmıştır. 37°C’de 48 saat inkübasyonun ardından seçici besiyerinde gelişen koloniler sayılmış ve sonuçlar log kob/mL olarak hesaplanmıştır

Oral yoldan verilen OZF suşunun fekal örneklerden elde edilen koloni ile aynı olup olmadığını doğrulamak amacıyla spesifik PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla suşun pediyosin AcH/PA-1 üretim özelliği dikkate alınarak spesifik primerler tasarlanmıştır (Çizelge 3.2). Bakteri gelişiminin gözlemlendiği petrilere rastgele tek çekilen koloniler, 50 µl steril TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 7.5) çözeltisinde çözülmüş ve 10 dakika kaynatılmıştır. 7500 devirde 10 dakika santrifüjü takiben DNA’yı içeren üst faz PZR’de kalıp olarak kullanılmıştır (Suwanjinda vd. 2009). 200 µl’lik PZR tüpüne toplam hacim 25 µl olacak şekilde kalıp DNA’dan (20 ng) 5 µl, her bir dNTP’den 2.5 mM, 100 µM primer F ve R, 10 µl tampon ve 0.5 µL Taq DNA polimeraz ilave edilmiştir. PZR işlemi “Gradient PCR Thermocycler/Thermo Scientific (USA)” cihazında 98°C’de 1,5 dakika ön denatürasyonun ardından her biri kendi içinde 98°C’de 10 saniye denatürasyon, 55°C’de 30 saniye primer bağlanması ve 72°C’de 15 saniye uzama basamaklarından oluşan toplam 25 döngüde gerçekleştirilmiştir. Son olarak 72°C’de 1 dakika ilave bir uzama basamağı eklenmiştir. Elde edilen PZR ürünü % 1 agaroz içeren jelde 100 V’de yürütülmüş ve moleküler büyüklüğü Gene-mixed

ruler DNA markörü (**EK-1**) kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmada pozitif kontrol olarak oral yoldan verilen pediyosin Ach/PA-1 üreticisi *P. pentosaceus* OZF suşundan izole edilen DNA kullanılmıştır.

#### **3.2.5.2 Kapsüle edilmiş *Pediococcus pentosaceus* OZF suşunun bağırsağa tutunma (adezyon) kapasitesinin belirlenmesi**

Kapsüle edilmiş *P. pentosaceus* OZF suşunun bağırsağa tutunma özelliğinin belirlenebilmesi amacıyla kantitatif PZR (q-PZR) kullanılmıştır. Beslemenin tamamlandığı 15. günü takip eden 24. saatte ötenazi gerçekleştirilmiş ve ileum örnekleri aseptik koşullarda alınmıştır. Toplam DNA izolasyonu NucleoSpin Soil kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokol (**EK-4**) dahilinde gerçekleştirilmiştir. Bağırsağa tutunan bakteri sayısının belirlenebilmesi amacıyla pediyosin Ach/PA-1 genine özgü spesifik primerlerin kullanıldığı kantitatif PZR (q-PZR, Bio-Rad Chromo4 USA) işlemi, 12.5 µl Brilliant II SYBR® Green, 0.5 µl primer (10 µM), 10.5 µl su ve 1 µl DNA (20 ng) örneği içermektedir. 98°C’de 1,5 dakika ön denatürasyonun ardından her biri kendi içinde 98°C’de 10 saniye denatürasyon, 55°C’de 30 saniye primer bağlanması ve 72°C’de 15 saniye uzama basamaklarından oluşan toplam 25 döngüde gerçekleştirilmiştir. Son olarak 72°C’de 1 dakika ilave bir uzama basamağı yer almıştır

#### **3.2.5.3 Kapsüle edilmiş *Pediococcus pentosaceus* OZF suşunun mikrobiyota üzerine etkisinin belirlenmesi**

Her iki çalışmada da aseptik koşullarda toplanan kör bağırsak içerisindeki fekal örnekler ve mikrobiyal içeriğin belirlenmesi amacıyla bu örneklerden izole edilen metagenomik DNA kullanılmıştır. Ötenazi ardından aseptik koşullarda toplanan kör bağırsak içerisindeki fekal örnekler dikkatli bir şekilde tartılarak miktarları belirlenmiştir. Metagenomik DNA izolasyonu NucleoSpin Soil kit kullanımı ile üretici firmanın önerdiği protokol takip edilerek gerçekleştirilmiştir.

##### **3.2.5.3.1 Kantitatif PZR (q-PZR)**

Kantitatif PZR (q-PZR) çalışmaları, kapsüle edilen *P. pentosaceus* OZF suşunun bağırsak mikrobiyal kompozisyonuna herhangi bir etkisinin olup olmadığını anlamak

amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.2’de belirtilen bazı primerlerin kullanımı ile q-PZR çalışması gerçekleştirilmiştir (Possemiers vd. 2006, Ramirez-Farias vd. 2009). İntestinal mikrobiyal komünite kompozisyonu üzerinde kapsüle edilen ve edilmeyen OZF suşunun kantitatif etkisini belirlemek için Quantitative PCR (qPCR) yapıldı. Genel mikrobiyatadaki toplam bakteriler ve özellikle Lactobasiller, Bifidobakteriler, Bakteriodesler ve *E. coli* için uygulanan qPCR’de Possemiers vd.’nin (2006) ve Ramirez-Farias vd. (2009)’nin çalışmaları temel alınmıştır. Çalışmada kullanılan PZR master karışımının içerisinde 12.5 µl Brilliant II SYBR® Green, 0.5 µl of primer (10 µM), 10.5 µl su ve 1 µl DNA (20ng) yer almaktadır. Tüm PZR çalışmaları her biri kendi içerisinde 95°C’de 10 dakika ön denatürasyon, 60°C’de 1 dakika primer bağlanması ve 72°C’de 1 dakika uzama basamaklarından oluşan toplam 25 döngüde gerçekleştirilmiştir. Genlerin kopya sayıları belli bir denklem kullanılarak hazırlanan standart eğri üzerinden belirlenmiş ve bu işlem Bordeaux Üniversitesinde yapılmıştır.

Çizelge 3.2 PZR çalışmalarında kullanılan primerler (F: ileri; R: geri)

| Primer                   | Dizi (5’-3’)                                                                                                                                                         |
|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Pediyosin</b>         | (F) 5' TTGGCTAGGCCACGTATTGG 5' (R) 5' GCAAACGCCTGAACGACA AG 3'                                                                                                       |
| <b>Lactobacillus</b>     | (F) 5' AGCAGTAGGGAATCTTCC 3' (R) 5' CACCGCTACACATGGAG 3'                                                                                                             |
| <b>Bifidobacterium</b>   | (F) 5' CCACATGATCGCATGTGATTG 3' (R) 5' CCGAAGGCTTGCTCCCCAAA 3'                                                                                                       |
| <b>Bacteroides</b>       | (F) 5'GAAGGTCCCCCACATTG 3' (R) 5'CGCKACTTGGCTGGTTTCAG 3'                                                                                                             |
| <b>E. coli</b>           | (F) 5' CATGCCGCGTTGTATGAAGAA 3' (R) 5' CGGGTAACGTCAATGAGCAAAA 3'                                                                                                     |
| <b>Genel mikrobiyota</b> | (F) 5' CCT ACG GGA GGC AGC AG 3' (R) 5' ATT ACC GCG GCT GCT GGC A 3'<br>(R) 5' CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGC GGC CCG GGG GCA CCG GGG ATT<br>ACC GCG GCT GCT GGC 3' |

### 3.2.5.3.2 Denatüre gradient jel elektroforezi (DGGE) ve klonlama

Metagenomik DNA üzerinden 341F (5' CCT ACG GGA GGC AGC AG 3' ) ve 534Rm (5' CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGC GGC CCG GGG GCA CCG GGG ATT ACC GCG GCT GCT GGC 3') evrensel primerlerinin kullanımı ile sadece toplam bakteri DNA’ları çoğaltılmıştır (Çizelge 3.2) (de Wiele vd. 2004, Waldram vd. 2009). Reaksiyon bileşenleri 1 µl kalıp DNA (50 ng), 2.5 mM dNTP, 100 µM primer, 10 µl tampon ve 0.5 µL Taq DNA polimeraz içermekte olup, program 95°C’de 15 dakika birinci denatürasyon, 95°C’de 15

saniye ikinci denatürasyon, 60°C’de 30 saniye primer bağlanması ve 72°C 30 saniye uzama basamaklarını içeren toplam 25 döngüden oluşmaktadır. Elde edilen PZR ürünü, bağırsak mikrobiyal bakteri topluluğunun kompozisyonunu incelemek amacıyla % 45-55 denatüre gradient jel elektroforezi (DGGE) işlemine tabi tutulmuştur (de Wiele vd. 2004, Waldram vd. 2009). Elde edilen DGGE bant profilleri GEL-COMPARE (ApplMath Version 4.1) analiz programında Pearson korelasyon katsayısı temel alınarak incelenmiş ve gruplar arasındaki benzerlik indeksi hesaplanmıştır. Kümeleme analizi ise UPGMA kullanılarak oluşturulmuştur. DGGE bant profillerinde gruplar arası farklılık sergileyen bantlar seçilmiş ve bu bantlar aseptik koşullarda jel üzerinden kesilerek eppendorf içerisinde 20µl steril qH<sub>2</sub>O ile ezilmiş ve DNA’nın akrilamitten ayrılarak steril suya karışması sağlanmıştır. Elde edilen bu su PZR çalışmalarında kullanılmıştır. Ekstrakte edilen DNA molekülünün klonlama çalışmalarında kullanılabilmesi için toplam bakteri DNA’ları üzerinde yine evrensel olan 341F ve 534Rm primerlerinin kullanımı ile 16S rDNA bölgeleri tekrar çoğaltılmış ve elde edilen PZR ürünü direk olarak TOPO TA klonlama kitinde kullanılmıştır (EK 5). Kullanılan vektörün haritası ise EK 6’da verilmiştir. *E.coli* TOP10 suşuna transforme edilen rekombinantlar amfisilin içeren uygun besiyerinde (DYT) (EK 2) mavi-beyaz tarama yöntemi temel alınarak beyaz olan kolonilerden rastgele seçilmiş (3 tane/petri), kürdanka alınan koloniler PCR test tüpüne konularak M13 primer kullanımı ile PZR yapılmıştır. PZR, 94°C’de 4 dakika ön denatürasyonu takiben her biri kendi içerisinde 90°C’de 30 saniye, 58°C’de 30 saniye primer bağlanması ve 72°C’de 30 saniye uzama basamaklarından oluşan toplam 30 döngüde gerçekleştirilmiş ve 72°C’de 30 dakika son bir uzama basamağı eklenmiştir. PZR ürünlerinin (3 tane) dizi analizi Bordeaux Üniversitesi Merkez Laboratuvarında gerçekleştirilmiş ve sonuçlar NCBI’ya kaydedilmiştir.

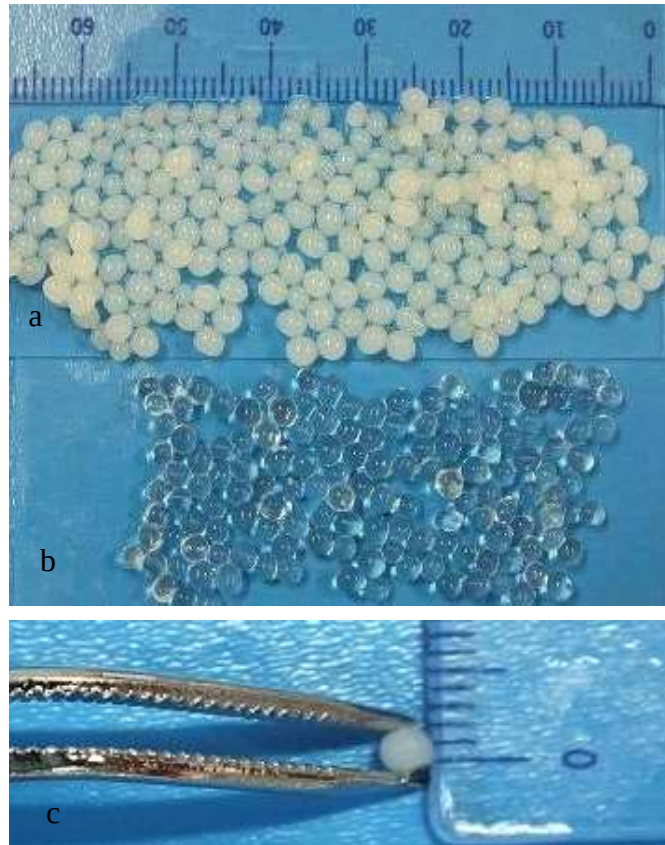
### 3.2.6 İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizler için SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) istatistik analiz programı kullanılmıştır. Veriler varyansın tek yön analizi olan ANOVA, Tukey posthoc testi ve bağımsız t-testi (GraphPad Software v.3.0, San Diego, CA, USA) kullanılarak değerlendirilmiştir. Tüm istatistik analizlerinde  $p < 0.05$  anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1 Kapsüllerin morfolojik yapıları

Kurutma, paketlenme ve depolama koşulları (örneğin, zaman, sıcaklık, nem ve oksijen) gibi ekstrenal faktörlerin sebep olduğu hasarlardan ve gastrointestinal sistemdeki degradasyondan (mide suyu ve safra tuzlarının ekstrem pH değerlerinden kaynaklanan) probiyotik bakterileri korumak için geliştirilen ve başarıyla uygulanan mikrokapsülleme teknolojilerinden aljinat ve peynir altı suyu proteinlerinin kullanımı ile gerçekleştirilen enkapsülasyon işlemi manuel olarak yapılmıştır. Yaklaşık 1-2 mm çapında liyofilize edilmiş kapsüllerin mikroskobik görüntüleri şekil 4.1’de verilmiştir.



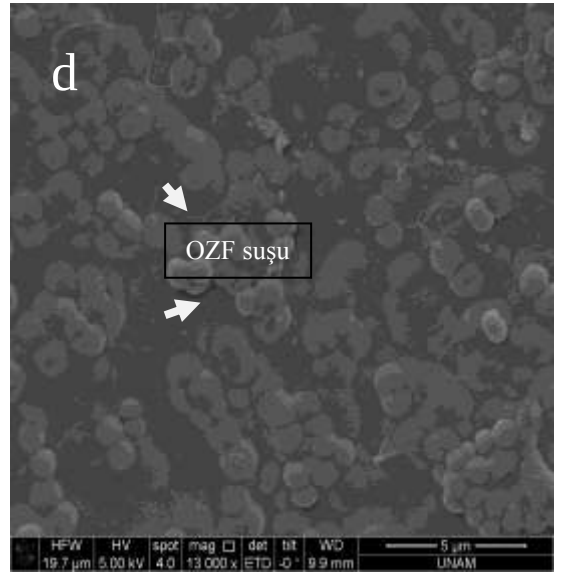
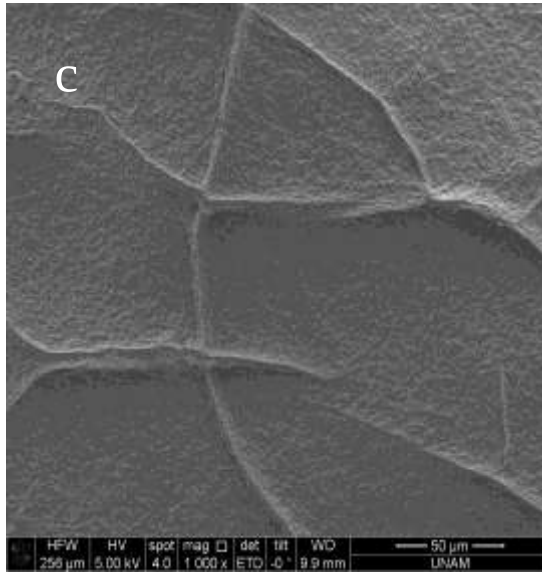
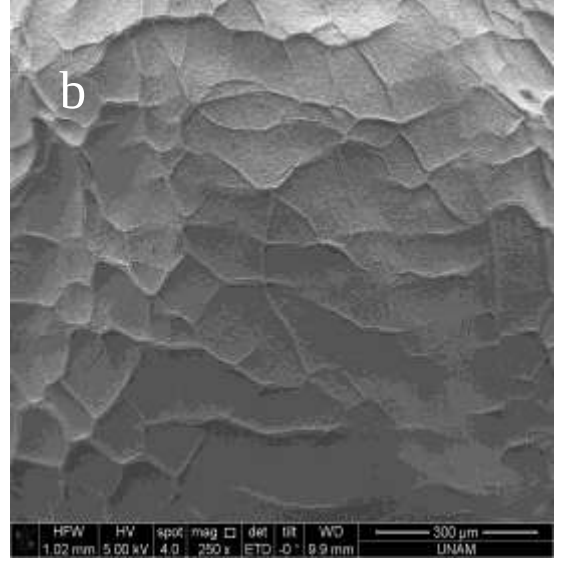
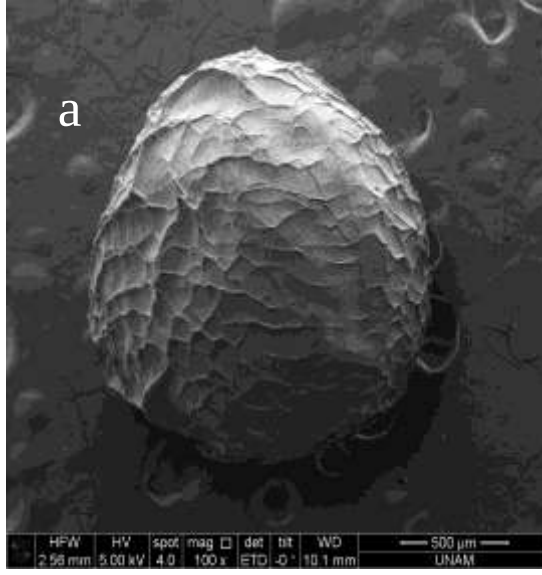
Şekil 4.1 Kapsüllerin makroskobik görüntüsü

a: *P. pentosaceus* OZF suşunu içeren aljinat+peynir altı suyu ile kaplanan kapsüller,  
b: Boş aljinat kapsülleri; c: kapsül çapı

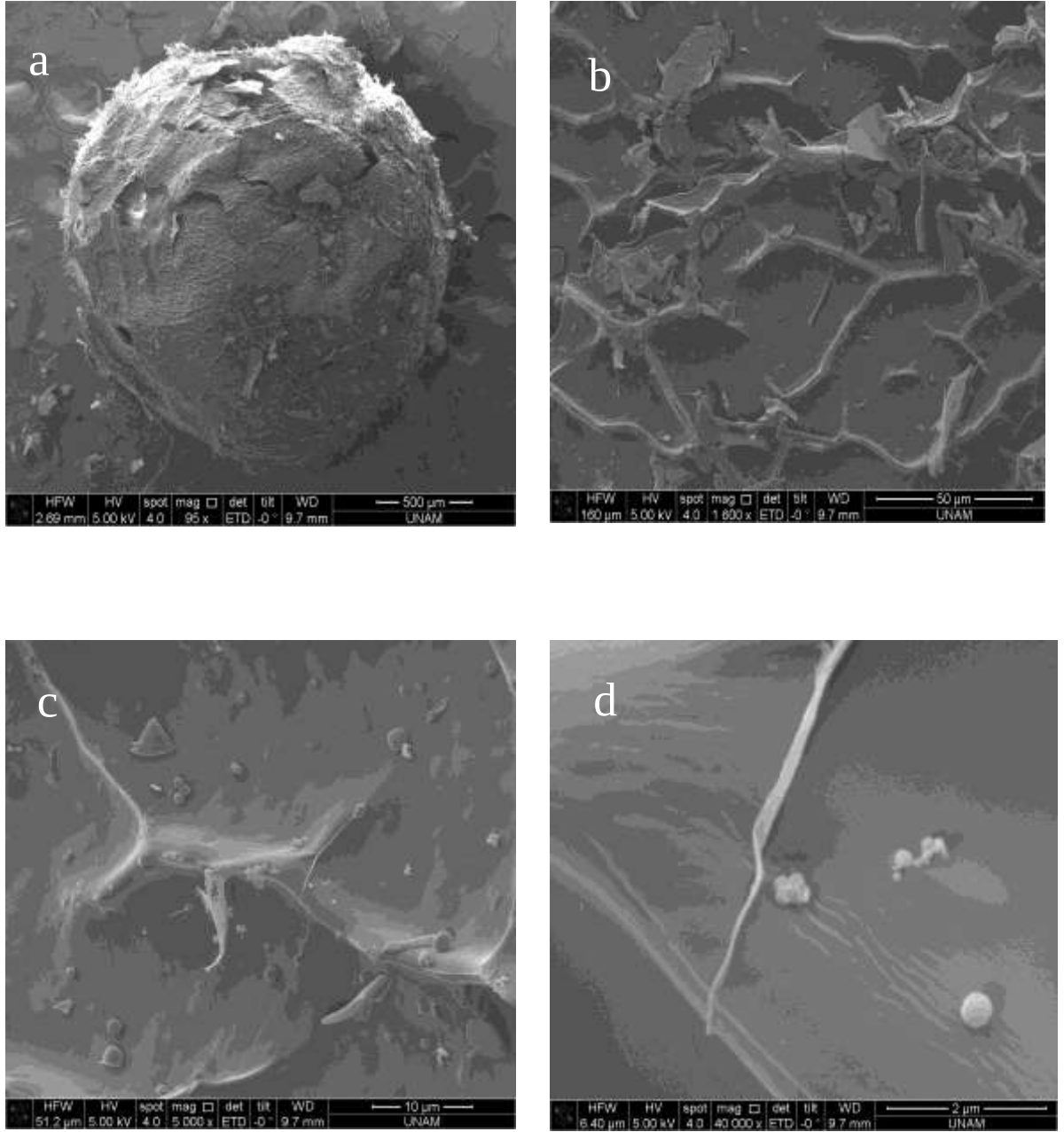
Kapsüllerin şekil ve yüzey karakteristiklerini gözlemlemek amacıyla yapılan SEM çalışmalarına ait mikrograflar Şekil 4.2 ve 4.3’de verilmektedir. SEM görüntülerinde kapsül mikroyapılarına ve bunların probiyotik bakterilerle interaksiyonlarına ait detaylar görülebilmektedir. Hem aljinat hem de aljinat-peynir altı suyu protein kapsüllerine ait SEM mikrograflarda moleküller oval, küresel-yapıda gözlenmiş olup ortalama çapları adı geçen sıra dahilinde  $1.5\pm0.20$  nm ve  $1.85\pm0.17$  nm olarak hesaplanmıştır.

1. Aljinat kapsüllerinin yüzey morfolojilerini ait SEM görüntüleri incelendiğinde, kapsüllerin pürüzsüze yakın bir yüzeye sahip oldukları görülmektedir. Yapmış olduğumuz denemelerde sodyum aljinat konsantrasyonunun mikrokapsüllerin yapısını etkilediğini gözlemlenmiştir; daha yüksek konsantrasyonlar yapı daha pürüzsüz bir hal kazanmaktadır. Sodyum alginat konsantrasyonunun yükseltilmesi  $Ca^{2+}$  iyonların bağlandığı bölge sayısını artırmakta, neticede daha yoğun çapraz bağlanmış jel yapısı oluşturulmaktadır. Yüksek büyütmede (Şekil 4.2.d) ise *P. pentosaceus* OZF suşunun kapsül içerisinde sıkışıp kaldığı (hapsedildiği) ve aynı zamanda duvar matriksi (aljinat) içindede bu hücrelerin rasgele ve eşit olarak dağılım gösterdiği görülmektedir.
2. Peynir altı suyu proteinleri amfoterik karakterleri nedeniyle kullanılmıştır. Alginat gibi negatif yüklü polisakaritler ile kolaylıkla karıştırılabilir ve pH değeri izoelektrik değerlerinin altında bir değere set edildiğinde (pH 7) proteinlerin net yükü pozitif olduğu için negatif yüklü polisakaritlerle interaksiyona girebilmektedir. Peynir altı suyu proteinleri ile kaplanan aljinat kapsülleri SEM’de incelendiğinde hapsedilen OZF suşuna ait hücreler çok az miktarda, çok yüksek büyütmelerde duvar matriksinin yüzeyinde gözlenmiştir, yani aljinat+peynir altı suyu proteinlerinden oluşan duvar matriksi bakteriyal hücreleri neredeyse tamamen hapsedmiş ve tamamen kaplamıştır.





Şekil 4.2 *P. pentosaceus* OZF içeren aljinat kapsüllerinin SEM görüntüsü



Şekil 4.3 *P. pentosaceus* OZF, aljinat ve peynir altı suyu proteinleri ile kaplanan kapsüllerin SEM görüntüsü

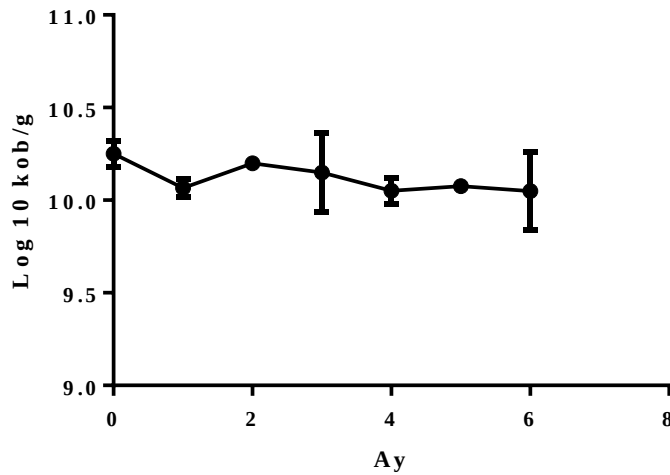
#### 4.2 Enkapsülasyon İşleminin OZF Suşunun Canlılığı Üzerine Etkisi

Kapsülasyon öncesi canlı hücre sayısı  $10^9$  kob/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Kapsülasyon çalışmaları sonrasında (hem aljinat hemde aljinat+peynir altı suyu proteinleri) canlı hücre sayısı  $10^{10}$  kob/gr olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar bize

enkapsülasyon işlemlerinin probiyotik hücrelerin hapsedilmesinde yüksek verimliliğe (%100) sahip olduğunu göstermektedir.

#### 4.3 Kapsüllerin Depolama Stabiliteleri

Depolama stabilitesinin belirlenmesinde aljinat ve peynir altı suyu karışımı ile kaplanmış kapsüller ( $10^{10}$  kob/gr) 4°C’de 6 ay depolanmış ve depolamanın başlangıcında ve ayda bir yapılan sayımlarla, kaplama işleminin mikroorganizmanın canlılığı üzerine etkisi belirlenmiştir. Deneme sonuçları şekil 4.4’de log kob/g olarak verilmiştir. Depolama sonucu elde edilen veriler incelendiğinde ( $10^{10}$  kob/gr) kapsülasyon işleminin *P. pentosaceus* OZF suşunun canlılığını 4°C’de 6 ay boyunca koruduğu tespit edilmiştir ( $p>0.05$ ).

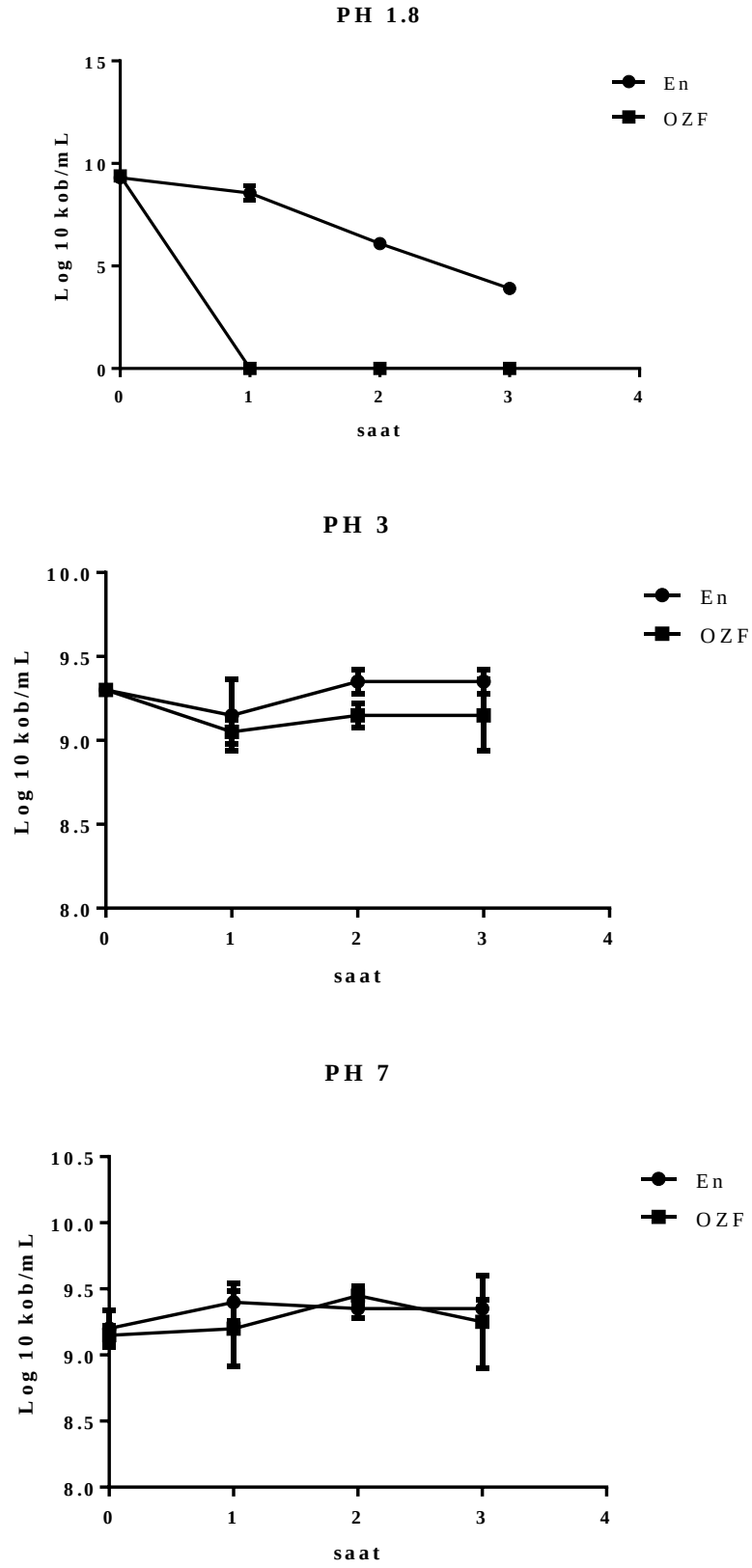


Şekil 4.4 Depolama süresince kapsüle edilmiş *Pediococcus pentosaceus* OZF suşunun canlılığı

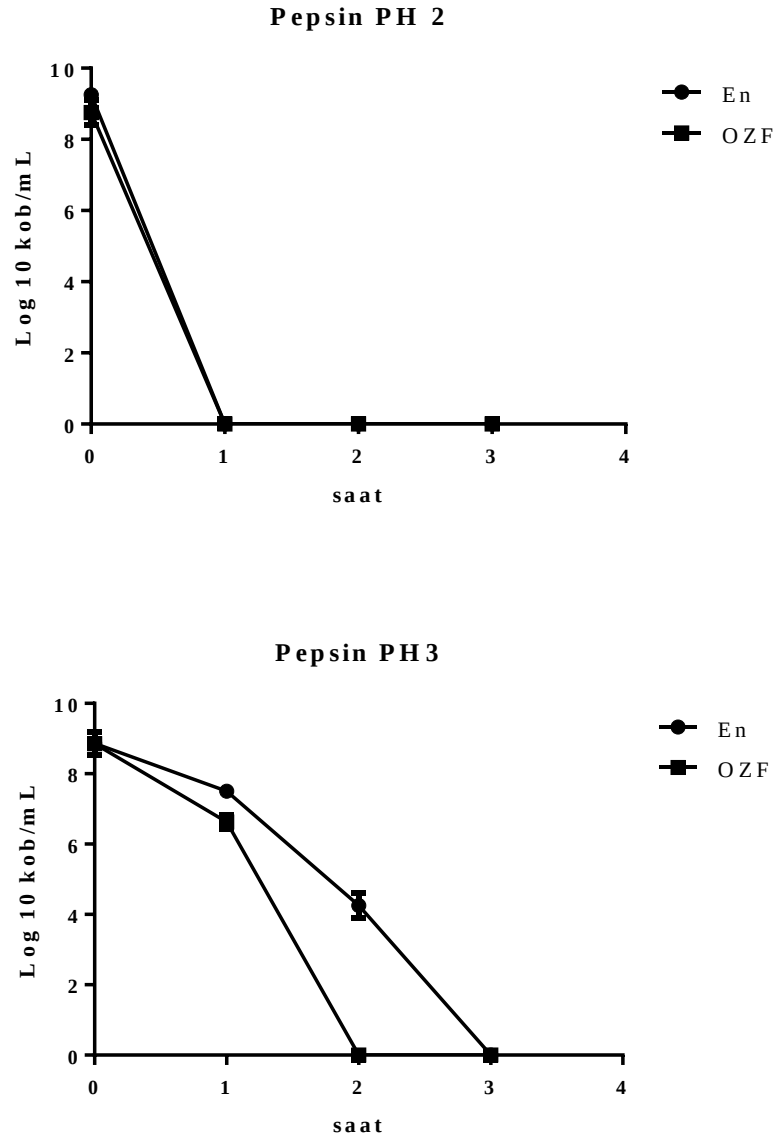
#### 4.4 Kapsüllerin *in vitro* Gastrointestinal Sistem Koşullarında Dayanıklılıklarının Belirlenmesi

Kapsülasyon işleminin, düşük pH’da (pH: 1.8 ve 3), pepsin, pankreatin ve safra tuzu içeren ortamlarda *P. pentosaceus* OZF suşunun canlılığı üzerine etkisi araştırılmıştır. Mide asitlik ortamı temel alınarak gerçekleştirilen çalışmada kapsüle edilmemiş OZF suşunun pH: 1.8’de 1 saat içerisinde canlılığını tamamen kaybettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.5). Bununla beraber kapsülasyon işlemi OZF suşunun canlılığı üzerinde olumlu

etkiler göstermiş ve 3. saatin sonuna kadar yaklaşık %50 oranında koruma sağlamıştır ( $p<0.05$ ). pH:3 ve 7’de gerçekleştirilen çalışmalarda ise kapsüle edilen ve edilmeyen OZF suşunun canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir kayıp tespit edilememiştir ( $p<0.05$ ). pH:2 ve pH:3’te gerçekleştirilen pepsin uygulamalarında ise pH:2 ortamında kapsülasyon işleminin canlılık üzerine olumlu herhangi bir etkisi tespit edilememiştir. Buna rağmen pH: 3’te 2. saatin sonunda kapsüle edilmeyen OZF suşunun canlılığı tamamen kaybolmuş, kapsüle edilen suş ise %50 oranında canlılığını korumuştur. İnkübasyonu takip eden 3. saatte ise canlılık tamamen kaybolmuştur (Şekil 4.6).



Şekil 4.5 Kapsüle edilen ve edilmeyen *P. pentosaceus* OZF suşunun düşük pH ortamlarında canlılık durumu



Şekil 4.6 Kapsüle edilen ve edilmeyen *P. pentosaceus* OZF suşunun pepsin ortamlarında canlılık durumu

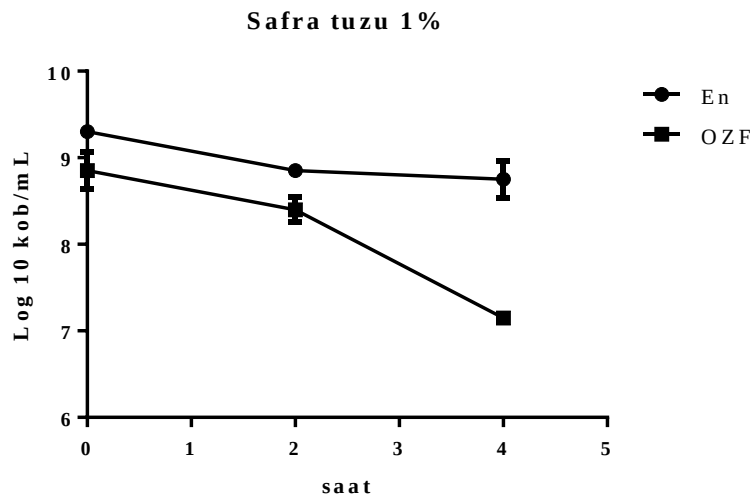
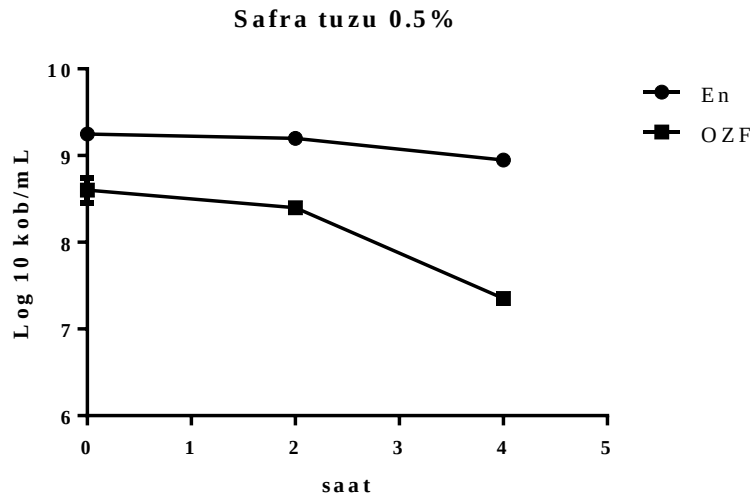
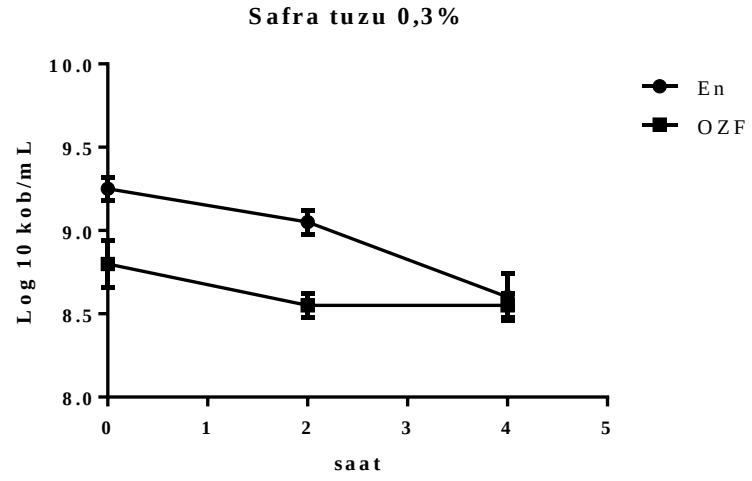
Sonuçlar safra tuzu dirençliliği açısından değerlendirildiğinde, % 0.3 safra tuzu içeren ortamda 4. saat inkübasyon neticesinde kapsüle edilen ve edilmeyen OZF suşunun canlılığının %50 oranında azaldığı ve kapsülasyonun canlılık üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Bununla beraber % 0.5 ve 1 oranında safra tuzu içeren ortamlarda 4. saat inkübasyonu takiben, kapsüle edilmeyen OZF suşunun canlılığında yaklaşık % 20 oranında azalma meydana gelmesine rağmen kapsüle edilen suşun canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmemiştir ( $p>0.05$ ) (Şekil 4.7). Pankreatinle muamele neticesinde ise 4. saatin sonunda hem kapsüle edilen hem de

edilmeyen OZF suşunun canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiş ( $p>0.05$ ) ve canlılık yaklaşık %90 oranında korunmuştur (Şekil 4.8).

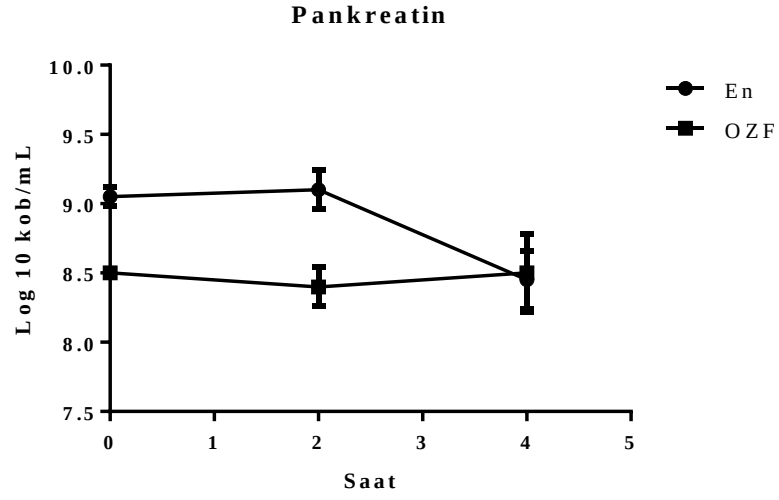
#### 4.5 *In vivo* Çalışmalar

##### 4.5.1 Kapsüle edilmiş *Pediococcus pentosaceus* OZF suşunun fare gastrointestinal sisteminden canlılığını koruyarak geçişi

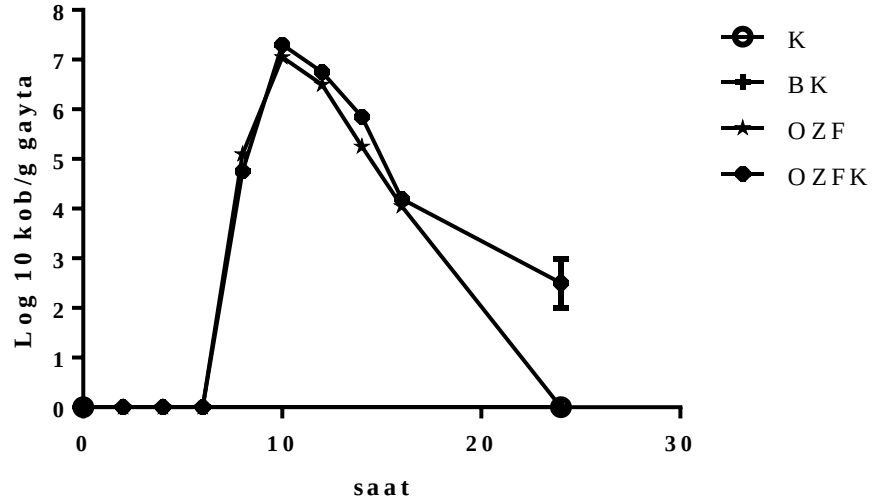
*P. pentosaceus* OZF suşunun Gİ sistemden geçişi ve bu süreçte canlılığının devamı oral yoldan uygulamayı takiben fekal örneklerde analiz edilmiştir. Bu amaçla 1. kontrol grubunda yer alan farelere (K) her gün düzenli bir şekilde SF, 2. kontrol grubunda yer alan farelere (BK) boş kapsül, 1. deney grubunda yer alan farelere (OZF) OZF suşu, 2. deney grubunda yer alan farelere ise (EN) OZF içeren kapsüller verilmiştir. Uygulamayı takip eden ilk 24 saatlik süreçte her 2 saatte bir fekal örnekler alınmış ve OZF suşunun varlığı, seri seyreltme işlemini takiben antibiyotik içeren seçici besiyerine yapılan ekimler sonucunda log kob/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9). OZF suşu beslemeyi takip eden 6. saatten itibaren fekal örneklerde tespit edilebilmiştir. 10. saatte ise en yüksek sayısına (7 log) ulaşmıştır. Bu sürenin devamında ise tespit edilen bakteri sayısında azalma gözlemlenmiştir. 24. saatte alınan fekal örneklerde kapsüle edilmeyen OZF suşu ile beslenen grupta bakteriye rastlanmamıştır. *Aynı saatte kapsüle edilen OZF suşu ile beslenen grupta ise çok az sayıda bakteriye rastlanmıştır (yaklaşık 2 log). Bununla beraber kontrol gruplarına ait fekal örneklerde herhangi bir gelişme gözlenmemiştir.*



Şekil 4.7 Kapsüle edilen ve edilmeyen *P. pentosaceus* OZF suşunun safra tuzu ortamlarında canlılık durumu



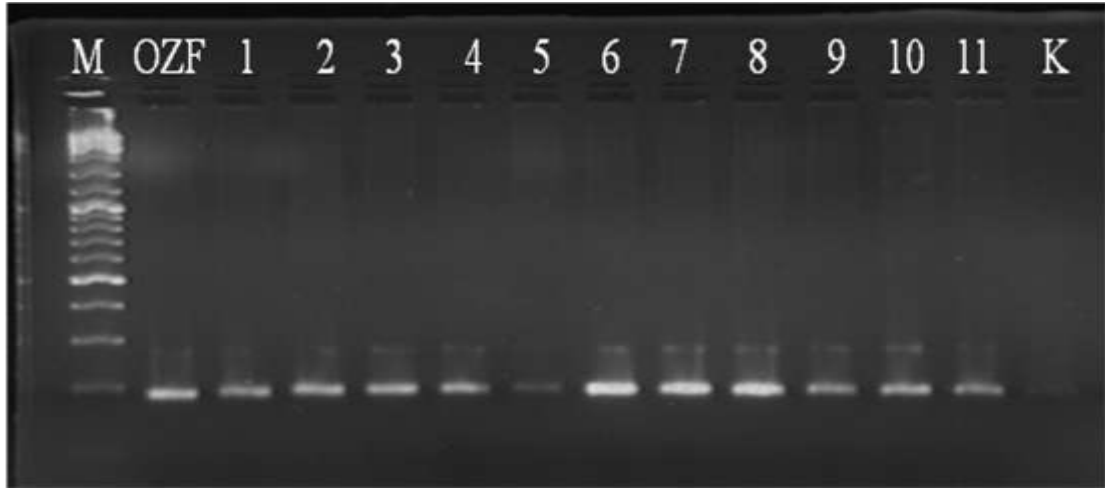
Şekil 4.8 Kapsüle edilen ve edilmeyen *P. pentosaceus* OZF suşunun pankreatin ortamında canlılık durumu



Şekil 4.9 Beslemeyi takip eden ilk 24 saatlik süreçte deney grubu fekal numunlerinde tespit edilen bakteri sayım sonuçlarına ait grafik

*In vivo* sistemde kapsüle olan ve olmayan OZF suşunun ( $10^8$  kob/fare) farenin GI sistemini geçtikten sonra (transit) 10. saatte  $10^7$  kob/fekal gr bulunmuştur. Yani, bu suş canlılığını kaybetmeden başarılı bir şekilde transsit geçti. 10.cu saatte maksimum sonuç alındı ve 10.cu saatten 14 saat sonrasına kadar (24. saat) suş canlı bir şekilde varlığı korudu

Mikrobiyolojik sayıma ilaveten, kanamisin (10mg/l), vankomisin (10mg/l) ve amfisilin (1mg/l) içeren MRS besiyerinde gelişen koloniler rastgele tek çekilerek bu kolonilerden elde edilen ve PZR de kalıp olarak kullanılan süspansiyonun pediyosin üreticisi *P. pentosaceus* OZF suşu olup olmadığı tespit edilmiştir. Elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü (Şekil 4.10) incelendiğinde oral yoldan verilen OZF suşundan ve fekal örneklerden rastgele çekilen 11 koloniden elde edilen DNA örneklerinde yaklaşık 200 bp'lık pediyosin Ach/PA-1 gen bölgesinin varlığı tespit edilmiştir.



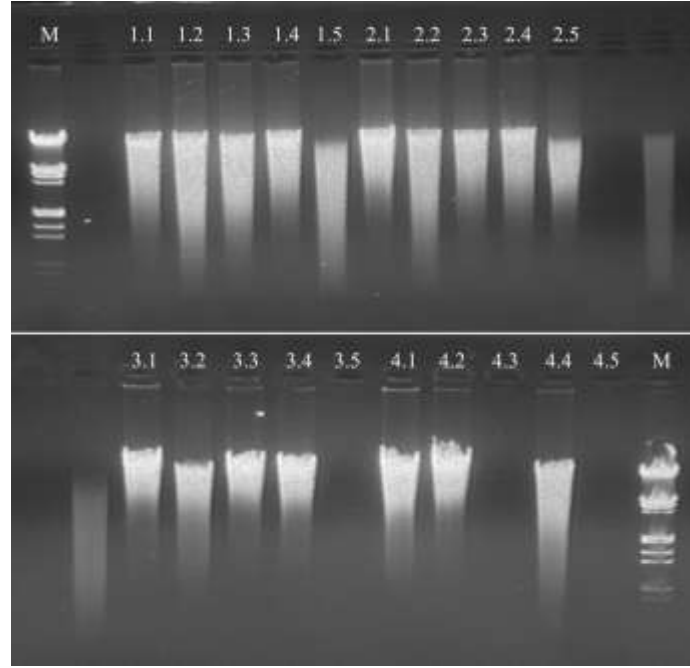
Şekil 4.10 Pediyosin Ach/PA-1 üretiminden sorumlu gen bölgesi temel alınarak tasarlanan primerlerin kullanımıyla elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

[M: markör (EK 1, şekil 1), K. Negatif kontrol, OZF: Oral yoldan verilen *P. pentosaceus* OZF suşunun multipleks PZR profili, 1-11: Beslemenin ardından fekal örneklerde bulunan ve antibiyotik spesifik besiyerinde gelişen kolonilerden rastgele çekilen örneklerin PZR profili]

#### 4.5.2 Kapsüle edilmiş *Pediacoccus pentosaceus* OZF suşunun bağırsağa tutunma (adezyon) kapasitesi

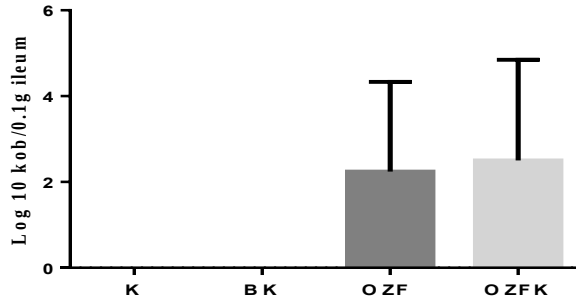
Kapsüle edilmiş *P. pentosaceus* OZF suşunun bağırsağa tutunma özelliğinin belirlenebilmesi amacıyla, kontrol ve deney grubuna ait farelerin ileum örneklerinden elde edilen DNA'nın (Şekil 4.11) kalıp olarak kullanıldığı q-PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. Bağırsağa tutunan OZF sayısı pediyosin Ach/PA-1 geninin kopya

sayıları ile tespit edilmiştir (Şekil 4.12). Kontrol gruplarında pediyosin gen ifadesi tespit edilememiştir. Bununla beraber canlı OZF (8 log kob/uygulama) ile beslenen grupta 15. günü takip eden 24. saatte bağırsağa tutunan bakteri sayısı sadece 2 log olarak tespit edilebilmiştir. Kapsüle edilen suşun tutunma özelliği de bu grupta benzer sonuçlar sergilemiştir (2.5 log,  $p>0.05$ ).



Şekil 4.11 Kontrol ve deney grubuna ait farelerin ileumlarına ait DNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü

[M: markör (EK 1, şekil 2), 1.1.-1.5: sadece su ile beslenen fare grubuna ait örnekler; 2.1.-2.5: boş kapsül ile beslenen beslenen fare grubuna ait örnekler; 3.1-3.5: OZF suşu ile beslenen beslenen fare grubuna ait örnekler; 4.1-4.5: kapsüle edilmiş OZF suşu ile beslenen beslenen fare grubuna ait örnekler]

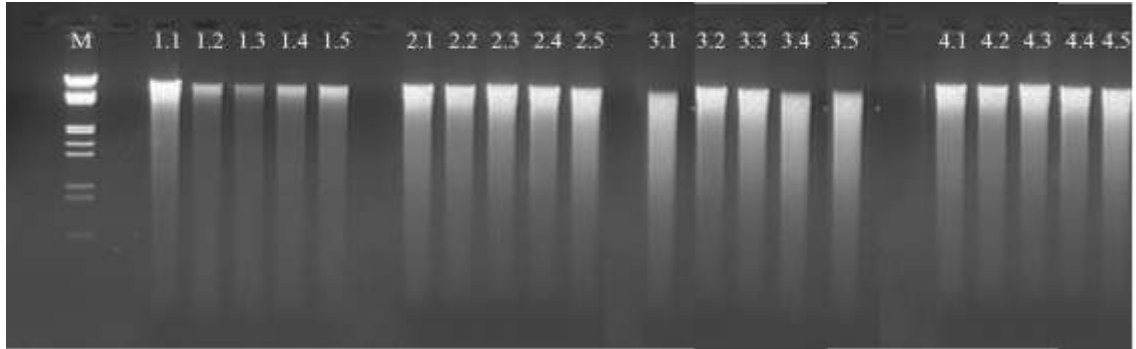


Şekil 4.12 Kontrol ve deney gruplarında bağırsağa tutunan bakteri sayısını gösteren q-PZR sonuçları

#### 4.5.3 Kapsüle edilmiş *Pediococcus pentosaceus* OZF suşunun mikrobiyota üzerine etkisi

##### 4.5.3. 1 Kantitatif PZR (q-PZR)

Kapsüle edilen *P. pentosaceus* OZF suşunun bağırsak mikrobiyal kompozisyonuna herhangi bir etkisinin olup olmadığını anlamak amacıyla, kontrol ve deney grubuna ait farelerin bağırsak içerisindeki fekal örneklerden elde edilen DNA'nın (Şekil 4.13) kalıp olarak kullanıldığı q-PZR işlemi gerçekleştirilmiştir



Şekil 4.13 Kontrol ve deney grubuna ait farelerin feçeslerine ait DNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü

[M: markör (EK 1, şekil 2), 1.1.-1.5: sadece su ile beslenen fare grubuna ait örnekler; 2.1.-2.5: boş kapsül ile beslenen beslenen fare grubuna ait örnekler; 3.1-3.5: OZF suşu ile beslenen beslenen fare grubuna ait örnekler; 4.1-4.5: kapsüle edilmiş OZF suşu ile beslenen beslenen fare grubuna ait örnekler]

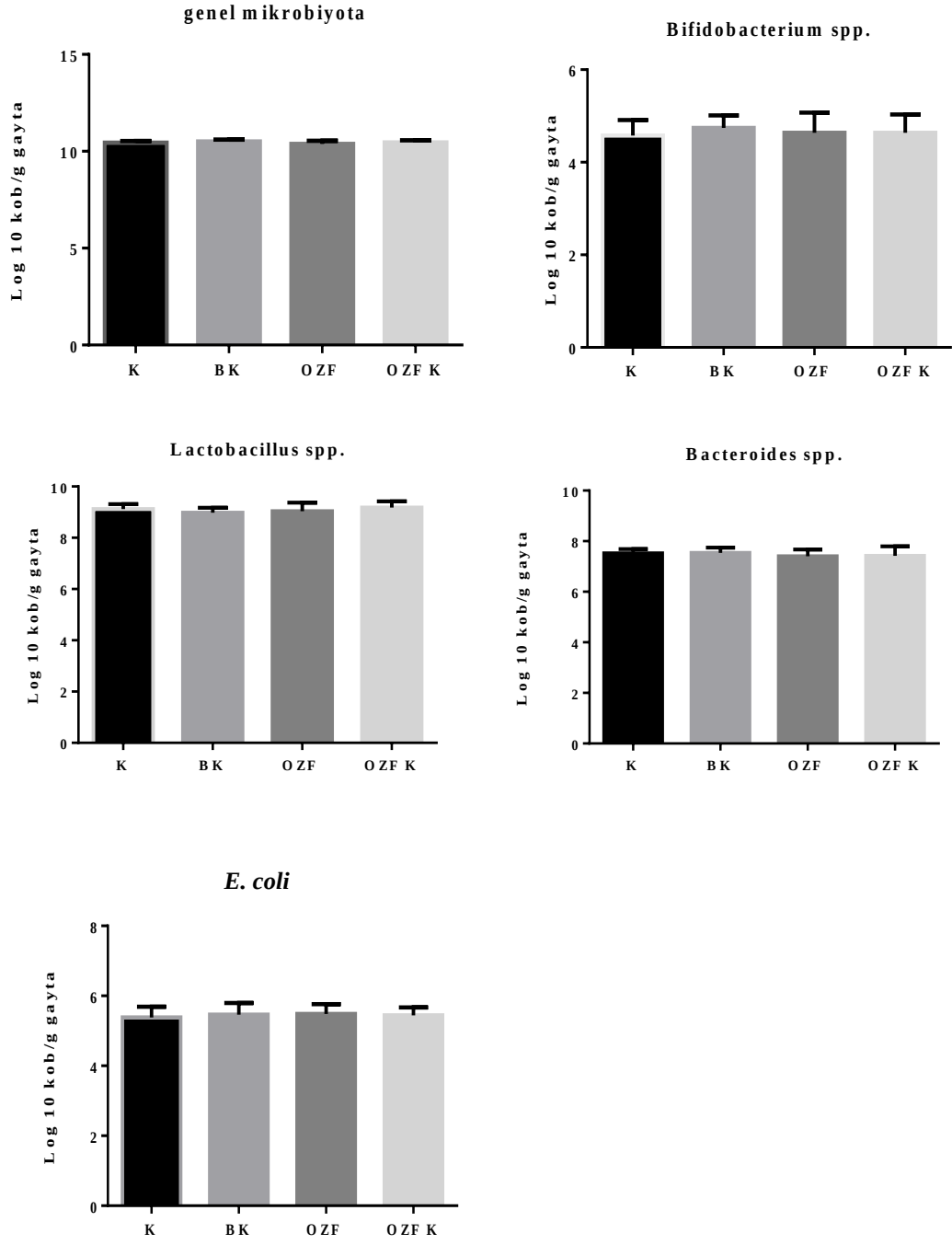
Farklı bakteri gruplarına ait spesifik primerlerin kullanımı neticesinde gerçekleştirilen q-PZR çalışmasında elde edilen gen kopya sayılarını içeren sonuçlar şekil 4.14’de belirtilmiştir. Kontrol ve deney grubuna ait farelerin mikrobiyota analizi genel mikrobiyota, bifidobakteriler, laktobasiller, *E.coli* ve bakterioides grubu açısından incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir ( $p>0.05$ ).

#### 4.5.3.2. Denatüre gradient jel elektroforezi (DGGE) ve klonlama

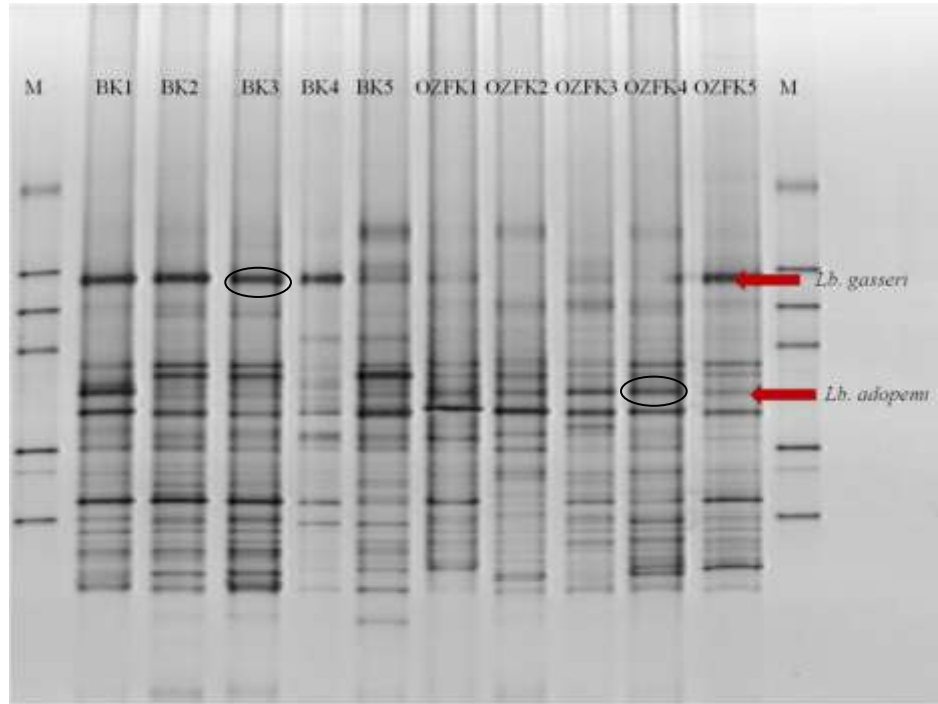
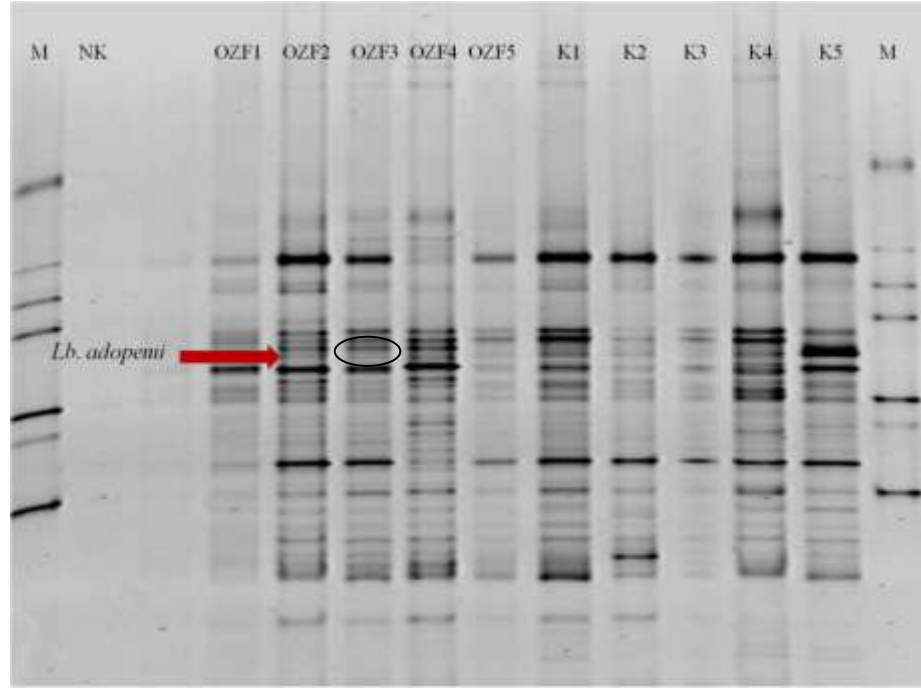
Çalışma grupları arasında bağırsak mikrobiyal topluluğunun bileşimindeki farklılıkları tespit edebilmek için fekal örneklerden elde edilen metagenomik DNA üzerinden evrensel primerlerinin kullanımı ile 16S rDNA bölgesi amplifiye edilmiş ve elde edilen PZR ürünü, bağırsak mikrobiyal bakteri topluluğunun kompozisyonunu incelemek amacıyla % 45-55 denatüre gradient jel elektroforezi (DGGE) işlemine tabi tutulmuştur

DGGE bant profilleri incelenerek gruplar arası farklılık sergileyen anlamlı 2 majör bant seçilmiş (tüm gruplarda ortak olan ya da olmayan, kırmızı ok ile gösterilen) ve bunların arasından seçilen 3 tanesi (daire içinde gösterilen, OZF3, BK3,OZFK4) jel üzerinden alınarak klonlama işlemine tabi tutulmuştur. 16S rDNA temelli dizi analiz sonuçlarına göre canlı OZF ile beslenen grup kontrol grupları (K) ile karşılaştırıldığında canlı OZF ile beslenen grupta *Lb. apodemi* suşunun varlığı tespit edilmiştir. Bununla beraber, kapsüle edilmiş OZF suşu ile beslenen grup ile boş kapsül verilen kontrol grupları karşılaştırıldığında boş kapsül verilen grupta *Lb. gasseri* suşunun varlığına rastlanmıştır, bununla beraber bu bakterinin varlığına OZFK5 dışındaki gruplarda (OZFK1, OZFK2, OZFK3 ve OZFK4) rastlanmamıştır. Benzer şekilde yapılan sekans analiz sonuçlarına göre boş kapsül verilen kontrol grupları ile kapsüle edilmiş OZF suşu ile beslenen grup karşılaştırıldığında kapsüle edilmiş OZF suşu ile beslenen gruplarında *Lb. apodemi* suşunun varlığına rastlanmıştır.

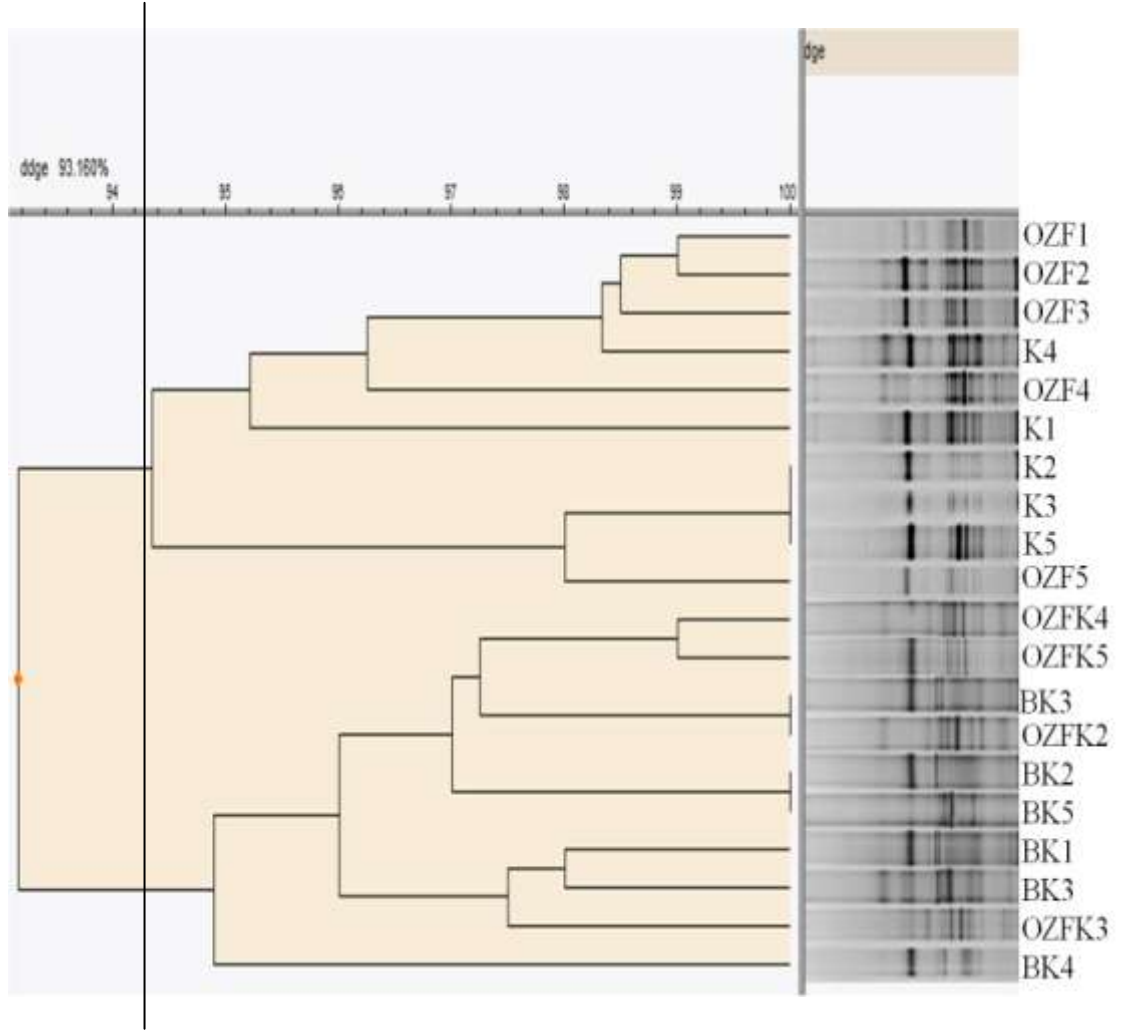
Elde edilen DGGE bant profilleri GEL-COMPARE (ApplMath Version 4.1) analiz programında Pearson korelasyon katsayısı temel alınarak incelendiğinde gruplar arasındaki benzerlik indeksi %90 ve üzerinde hesaplanmıştır. Kümeleme analizi (UPGMA) temel alınarak yapılan incelemede (Şekil 4.16) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir ( $p>0.05$ ).



Şekil 4.14 Kontrol ve deney gruplarına ait fekal örneklerde tespit edilen farklı bakteri gruplarının sayısını gösteren q-PZR sonuçları



Şekil 4.15 Kontrol ve deney grubuna ait farelerin fekal örneklerinden çoğaltılan 16S rDNA gen bölgelerinin DGGE görüntüsü



Şekil 4.16 DGGE profillerinin kümeleme analizi

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda probiyotik ve prebiyotikleri içeren fonksiyonel sinbiyotik gıdaların kullanımı oldukça güncel hale gelmiştir. Probiyotik bakterilerin gıdalara eklenmesi ise, hastalıklardan korunma ve yaşam kalitesinin yükseltilmesine yönelik olarak bilimsel ilgide bir artış uyandırmıştır. Fonksiyonel probiyotik gıdalardaki en büyük sorun, belli sayıda canlı mikroorganizma içermeye zorunluluğudur. Gerek gıdanın oluşum ve depolama aşamaları gerekse gastrointestinal sistem koşulları büyük oranda canlılık kaybına neden olabilmektedir. Bu zorunluluk ürünün raf ömrünü kısaltmaktadır. Bununla beraber, oral yoldan alınan canlı probiyotiklerin konak bağırsağına başarılı bir şekilde ulaşması oldukça zordur. Probiyotiklerin belirtilen bu stres koşullarında canlılıklarını koruyabilmeleri için çok sayıda yaklaşım geliştirilmiş olmasına rağmen çok az sayıda başarı elde edilebilmiştir. Bu ters çevresel koşullara karşı probiyotiklerin canlılığını ve stabilitesini artırmak için farklı yaklaşımlar önerilmiştir. Bu yaklaşımlar arasında yer alan mikroenkapsülasyon, işleme ve depolama esnasında probiyotik bakterilerin canlılığını ve stabilitesini geliştiren, aynı zamanda gastrointestinal sistemde hücrelerin hedeflenmiş bölgede kontrollü ve sürekli salınımlarını sağlayan etkili bir yaklaşımdır. Hem üretim maliyetinin düşük olması hemde tüketici sağlığı açısından sıkıntı yaratmaması bakımından umut vaat etmektedir.

Bu tez çalışmasında *P. pentosaceus* OZF suşunu olumsuz çevresel koşullardan korumak ve konak bağırsağına maksimum sayıda ulaşımını sağlayabilmek için **aljinat** ve **peynir altı suyu proteinleri** ile enkapsüle edilmiştir.

- Sheu ve Marshall (1993) yapmış oldukları çalışmada, sodyum aljinat konsantrasyonunun mikrokapsüllerin yapısını etkilediğini göstermiştir; daha yüksek konsantrasyonlar daha pürüzsüz bir yüzey üretmektedir. Sodyum alginat konsantrasyonunun yükseltilmesi  $Ca^{2+}$  iyonların bağlandığı bölge sayısını artırmakta, neticede daha yoğun çapraz bağlanmış jel yapısı oluşturulmaktadır (Chandramouli vd. 2004). Bizde yapmış olduğumuz çalışmada %3 aljinat kullanarak neredeyse pürüzsüz kapsül yapıları elde ettik.

- Peynir altı suyu proteinleri genellikle amfoterik karakterleri nedeniyle enkapsülasyon materyali olarak oldukça ilgi çekmektedir ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Alginat veya pektin gibi negatif yüklü polisakaritler ile kolaylıkla karıştırılabilir (Doleyles vd. 2002, 2004). pH değeri izoelektrik değerlerinin altında bir değere set edildiğinde (pH 7) proteinlerin net yükü pozitif olmakta ve negatif yüklü polisakaritlerle interaksyona girmektedir (Harnsilawat vd. 2006). Bu yüzden, biyo-uyumlu olan peynir altı suyu proteinleri genellikle kapsül geliştirmek veya bunların stabiliteilerini artırabilmek için jel boncuklarını kaplamak amacıyla kullanılmaktadır.

Çalışma OZF içeren aljinat kapsüllerinin peynir altı suyu proteinleri duvar matriksi ile kaplandığında daha iyi bir koruma sağladığı, OZF suşunu gastrointestinal sistemdeki ters koşullardan canlılığını muhafaza ederek geçtiği ve hedef bölgede kontrollü bir şekilde sürekli salınımına uğradığı tespit edilmiştir. Düşük maliyetinden, biyo-uyumluluğundan ve mide sıvısına direncinden dolayı peynir altı suyu proteinleri başarılı bir kaplama materyali olarak önerilmektedir. Kapsülasyon öncesi canlı OZF hücre sayısı  $10^9$  kob/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Kapsülasyon çalışmaları sonrasında (hem aljinat hemde aljinat+peynir altı suyu proteinleri) canlı OZF hücre sayısı  $10^{10}$  kob/gr olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar bize enkapsülasyon işlemlerinin probiyotik hücrelerin hapsedilmesinde yüksek verimliliğe (%100) sahip olduğunu göstermektedir.

Depolama sonucu elde edilen veriler incelendiğinde ( $10^{10}$  kob/gr) kapsüle edilen *P. pentosaceus* OZF suşunun canlılığını 4°C’de 6 ay boyunca koruduğu tespit edilmiştir ( $p>0.05$ ).

- Kapsülasyon işleminin depolama süresince suşların canlılık durumunu korumalarına yönelik olumlu etkileri birçok çalışmada gösterilmiştir. Sodyum aljinat kullanılarak kaplanan 4 farklı probiyotik kültürün canlılık durumları 4°C’de yapılan depolama işlemi neticesinde değerlendirilmiş ve kaplama işleminin probiyotiklerin canlılıklarını önemli ölçüde koruduğu tespit edilmiştir (Chen vd. 2005).

Bununla beraber çalışmamızda kaplama işleminin düşük pH, yapay mide ve bağırsak ortamlarında bakterinin canlılığı üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Sodyum aljinat ve peynir altı suyu proteinleri kullanılarak gerçekleştirdiğimiz kaplama işleminin, düşük pH ortamında 3 saatlik inübasyon sonucunda OZF suşunun canlılığını yaklaşık olarak %50 oranında koruduğu tespit edilmiştir. Birçok çalışma farklı polimerler ile gerçekleştirilen kapsülasyon çalışmalarının başarılı sonuçlandığını göstermektedir.

- Çalışmamıza benzer şekilde *L. acidophilus* ATCC 43121 damlatma yöntemi ve sodyum aljinat ile enkapsüle edilmiş ve kapsülasyonun yapay Gİ sistem koşullarına ve yüksek sıcaklığa karşı bakterinin canlı kalma oranı üzerine etkisi araştırılmıştır. Kapsüle edilmemiş hücreler düşük pH'da kısa sürede canlılıklarını kaybetmiş olmasına rağmen kaplanmış örneklerde sadece 3 log kob/g azalma tespit edilmiştir. Sonuç olarak enkapsülasyon işleminin özellikle asit ve sıcaklık uygulamalarında kullanılan suş üzerinede etkin bir şekilde koruyucu rol oynadığı belirlenmiştir (Kim vd. 2008).
- Bazı *L. plantarum* suşlarının enkapsülasyonu ile ilgili yapılan bir çalışmada ise, kaplama etkinliğini geliştirmek amacıyla kaplama materyali olarak aljinat ile birlikte peyniraltı suyu proteinleri kullanılmıştır. Yapay mide ve bağırsak sıvısı ortamında yapılan inaktivasyon denemelerinde, dondurularak kurutulan kapsüllerdeki çapraz bağların açılarak bakterilerin aljinat matriksinden salınımı incelenmiştir. Kaplanmış *L. plantarum* suşlarının canlılığı yapay mide sıvısı içerisinde 37°C'de 60 dakika inkübasyonu takiben incelenmiş ve bakterilerin en iyi canlı kalma oranının peyniraltı suyu proteinleri ve aljinat kullanılan kapsüllerde olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda araştırmacılar peyniraltı suyu proteinlerinin bakteri içeren aljinat kapsüllerinin kaplanması için uygun, ucuz ve verimli bir kaplama materyali olduğunu göstermişlerdir (Gbassi vd. 2009).
- Birçok çalışmada 2. kaplama işlemi farklı polimerlerin kullanımı ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda tasarladığımız kapsülasyon protokolüne benzer olarak, Teoh vd. (2011), *L. acidophilus* LA-5 suşunu aljinate ve nişasta kombinasyonu ile enkapsüle etmişlerdir. Enkapsülasyon işleminin özellikle gıda üretim aşamalarında karşılaşılabilecek yüksek sıcaklık ortamlarına ve gıda

matriksindeki yüksek tuz konsantrasyonuna karşı suşları koruduğu ve canlılık kapasitelerini arttırdığı tespit edilmiştir.

- Bunun aksine Sultana vd. (2000) *L. acidophilus* ve *B. bifidum* suşlarını aljinat-mısır nisaştası ile kaplamışlar ancak kaplama işleminin yüksek asit ve safra tuzu ortamında bakterilerin canlılıklarını arttırmada önemli bir etkisinin olmadığını belirlemişlerdir. Araştırmada ayrıca kaplanmış bakterilerin 8 haftalık depolama sonunda canlılıklarını 0,5 log birimi kaybettiği, serbest hücrelerin sayısında ise sadece 1 log birimi azalma olduğu tespit edilmiştir.

Son yıllarda probiyotik kullanımı mikrobiyotayı korumak ve hastalıkları oluşmadan önlemek için umut vaad eden bir yaklaşım olarak oldukça dikkat çekmektedir (Butel 2014). Probiyotikler ve prebiyotikler enterik mikrobiyota ile konak arasında simbiyotik ilişkiyi geliştirmek veya dengeyi yeniden sağlamak için kullanılmaktadır (Alonso ve Guarner 2013). Örneğin, *Lb. casei* Yakult suşu ticari olarak fermente ürünlerde kullanılan ve klinik çalışmalara sıklıkla dahil edilen önemli bir probiyotiktir. Spanhaak vd. (1998) bu suşun bağırsak florası üzerine olan metabolik etkilerini değerlendirmişler ve mikrobiyal kompozisyonu olumlu olarak etkilediğini belirlemişlerdir. Fuentes vd. (2008) *Lb. casei* ve *Lb. platarum* ile beslenme sonucunda fare intestinal mikrobiyotasında laktobasillusların sayısında artma meydana geldiğini rapor etmişlerdir. Ancak, herhangi bir probiyotiğin mikrobiyota üzerine olan etkisinin değerlendirilebilmesi için kullanılan probiyotiğin Gİ sistemden canlı olarak geçişinin ve bağırsağa tutunma özelliğinin belirlenmesi oldukça önemlidir.

OZF suşu beslemeyi takip eden 6. saatten itibaren fekal örneklerde tespit edilebilmiş, 10. saatte ise en yüksek değere ulaşan sayı zamanla azalma göstermiş ve 24. saatte tamamen kaybolmuştur. Bununla beraber, *P. pentosaceus* OZF suşunun bağırsağa tutunma özelliği beslemenin tamamlandığı 15. günü takip eden 24. saatte bağırsağa tutunan bakteri sayısının hesaplanması ile belirlenmiştir. Tutunmanın yüksek olması bağırsak mikrobiyotasına olan etkinin anlamlı olabilmesi için ilk işarettir. Ancak çalışmamızdan elde edilen veriler tutunmanın oldukça düşük olduğunu göstermektedir. Canlı OZF (8 log kob/uygulama) ile beslenen grupta 15. günü takip eden 24. saatte

bağırsağa tutunan bakteri sayısı sadece 2 log olarak tespit edilebilmiştir. Kapsüle edilen suşun tutunma özelliği de bu grupta benzer sonuçlar sergilemiştir (2.5 log,  $p>0.05$ ) .

Bununla beraber OZF suşunun kapsüle edilmesi tutunma yüzdesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki sergilememiştir. Kapsüle edilen ve edilmeyen OZF suşunun fare mikrobiyal kompozisyonu üzerine olan etkisi incelendiğinde, fare intestinal mikrobiyotasında çok az değişiklik tespit edilebilmesine rağmen genel olarak anlamlı hiçbir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Kontrol ve deney gruplarına ait DGGE bant profilleri incelendiğinde gruplar arasında farklılık sergileyen anlamlı 2 majör bandın varlığı dikkat çekmiş ve bunların arasından seçilen 3 tanesi jel üzerinden alınıp, klonlanarak sekansa tabi tutulduğunda canlı OZF ile beslenen grup kontrol grupları (K) ile karşılaştırıldığında canlı OZF ile beslenen grupta *Lb. apodemi* suşunun varlığı tespit edilmiştir. Bununla beraber, kapsüle edilmiş OZF suşu ile beslenen grup ile boş kapsül verilen kontrol grupları karşılaştırıldığında boş kapsül verilen grupta *Lb. gasseri* suşunun varlığına rastlanmıştır, bununla beraber bu bakterinin varlığına OZFK5 dışındaki gruplarda (OZFK1, OZFK2, OZFK3 ve OZFK4) rastlanmamıştır. Benzer şekilde yapılan sekans analiz sonuçlarına göre boş kapsül verilen kontrol grupları ile kapsüle edilmiş OZF suşu ile beslenen grup karşılaştırıldığında kapsüle edilmiş OZF suşu ile beslenen gruplarında *Lb. apodemi* suşunun varlığına rastlanmıştır. Bununla beraber, genel mikrobiyota, bifidobakteriler, laktobasiller, *E.coli* ve bakterioides gibi dominant gruplar açısından elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir fark tespit edilememiştir.

- Benzer sonuçlar pediyosin üreticisi *Lb. plantarum*'un kullanıldığı çalışmada da tespit edilmiştir (Bernboma vd. 2009). *Pediococcus pentosaceus* OZF suşu da pediyosin AcH/PA-1 üreticisidir (Osmanagaoglu vd. 2011). Bakteriyosin üreticisi suşların kommensal Gİ florasına nasıl etki ettiği henüz tam olarak anlaşılamamıştır.
- Probiyotik tüketimini takiben bağırsak mikrobiyal kompozisyonunda belli dominant grupların etkilendiğini gösteren çalışmalara literatürde rastlamak mümkündür (Goossens vd. 2005, Rochet vd. 2008).
- Collins vd. (2002) fermente sütün izole edilen *Lb. salivarius* UCC118 suşunun sağlıklı insanlar tarafından tüketiminin bağırsak mikrobiyotasında laktobasilleri

arttırdığını bununla beraber bifidobakteri, *E. coli* ve bakteroides grubunu değiştirmedini tespit etmişlerdir.

- *Lb. salivarius* türünün başka bir suşunu sağlıklı insanlar üzerinde kullanan Sierra vd. (2010) bifidobakterilerin bağırsak mikrobiyotasında arttığını, ancak bakteroides, Clostridium ve enterobakter gruplarının stabil kaldığını tespit emişlerdir.

Bu tez çalışmasında enkapsüle edilen ve edilmeyen *Pediococcus pentosaceus* OZF suşunun bağırsağa tutunma özelliğinin ve bağırsak mikrobiyal kompozisyonu üzerine olan etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar neticesinde, OZF suşunun bağırsağa tutunma kapasitesi oldukça düşük bulunmuş (6 log düşüş) ve fekal mikrobiyal kompozisyonu üzerinde dominant gruplar açısından herhangi bir değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir.

## KAYNAKLAR

- Almeida, C.C., Lorena, S.L., Pavan, C.R., Akasaka, H.M. and Mesquita, M.A. 2012. Beneficial effects of long-term consumption of a probiotic combination of *Lactobacillus casei* Shirota and *Bifidobacterium breve* Yakult may persist after suspension of therapy in lactose-intolerant patients. *Nutrition in Clinical Practice*, 27(2);247-251.
- Alonso, V.R. and Guarner, F. 2013. Linking the gut microbiota to human health. *British Journal of Microbiology*, 109(2); 21-26.
- Anonymous. 2002. FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, <http://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>, Erişim Tarihi: 09.10.2013).
- Anukam, K. C., Osazuwa, E., Osemene, G.I., Ehigiagbe, F., Bruce, A.W. and Reid, G. 2006a. Clinical study comparing probiotic *Lactobacillus* GR-1 and RC-14 with metronidazole vaginal gel to treat symptomatic bacterial vaginosis. *Microbes and Infection*, 8; 1-5.
- Anukam, K., Osazuwa, E., Ahonkhah, I., Ngwu, M., Osemene, G., Bruce, A.W. and Reid, G. 2006b. Augmentation of antimicrobial metronidazole therapy of bacterial vaginosis with oral probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14: Randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Microbes and Infection*, 8; 1450-1454.
- Bednorz, C., Guenther, S., Oelgeschlager, K., Kinnemann, B., Pieper, R., Hartmann, S., Tedin, K., Semmler, T., Neumann, K. and Schierack, P. 2013. Feeding the probiotic *Enterococcus faecium* strain NCIMB 10415 to piglets specifically reduces the number of *Escherichia coli* pathotypes that adhere to the gut mucosa. *Applied and Environmental Microbiology*, 79; 7896-7904.
- Bernboma, N., Jelle, B., Brogren, C., Vogensen, F.K., Nørnung, B. and Licht, T.R. 2009. Pediocin PA-1 and a pediocin producing *Lactobacillus plantarum* strain do not change the HMA rat microbiota. *International Journal of Food Microbiology*, 130; 251-257.
- Bhadoria, P.B.S. and Mahapatra, S.C. 2011. Prospects, technological aspects and limitations of probiotics-A worldwide review. *European Journal of Food Research and Review*, 1(2); 23-42.
- Boylston, T.D., Vinderola, C.G., Ghoddusi, H.B. and Reinheimer, J.A. 2004. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *International Dairy Journal*, 14; 375-387.

- Bouhnik, Y., Raskine, L., Simoneau, G., Vicaud, E., Florie, B., Brouns, F. and Bornet, FR. 2004. The capacity of nondigestible carbohydrate to stimulate fecal bifidobacteria in healthy human: a double blind, randomized, placebo-controlled, parallel group, dose response relation study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80; 1658-1664.
- Butel, M.J. 2014. Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 44(1); 1-8.
- Ceapa, C., Wopereis, H., Rezaiki, L., Kleerebezem, M., Knol, J. and Oozeer, R. 2013. Influence of fermented milk products, prebiotics and probiotics on microbiota composition and health. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 27; 139-155.
- Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P. and Jones, M. 2004. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methodology*, 56; 27–35.
- Chen, K.N., Chen, M.J, Liu, J.R, Lin, C.W. and Chiu, H.Y. 2005. Optimization of incorporated prebiotics as coating materials for probiotic microencapsulation. *Journal of Food Science*, 70; 260-266.
- Collins, J.K., Dunne, C., Murphy, L., Morrissey, D, O'Mahony, L., O'Sullivan, E. 2002. A randomised controlled trial of a probiotic *Lactobacillus* strain in healthy adults: assessment of its delivery, transit and influence on microbial flora and enteric immunity. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 14; 81-89.
- Cousin, F.J., Jouan-Lanhouet, S., Dimanche-Boitrel, M.T., Corcos, L. and Jan, G. 2012. Milk fermented by *Propionibacterium freudenreichii* induces apoptosis of HGT-1 human gastric cancer cells. *PLoS One*, 7(3); 1-12.
- Darwazeh, A. and Darwazeh, T. 2011. Probiotics and Oral Disease. *Smile Dental Journal*, 6(1); 1-8.
- Davidson, M.H. and Maki, K.C. 1999. Effects of dietary inulin on serum lipids. *Journal of Nutrition*, 129; 1474-1477.
- De Boever, P., Wouters, R., Verschaeve, L., Berckmans, P., Schoeters, G. and Verstraete, W. 2000. Protective effect of the bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* against bile salt cytotoxicity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53; 709-714.
- De Wiele, T.V., Boon, N., Possemiers, S., Jacobs, H. and Verstraete, W. 2004. Prebiotic effects of inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiology and Ecology*, 51; 143-153.

- Doleyres, Y., Fliss, I. and Lacroix, C. 2002. Quantitative determination of the spatial distribution of pure and mixed-strain immobilized cells in gels beads by immunofluorescence. *Applied and Microbiol Biotechnology*, 59; 297–302.
- Doleyres, Y., Fliss, I. and Lacroix, C. 2004. Continuous production of mixed lactic starters containing probiotics using immobilized cell technology. *Biotechnology Progress*, 20; 145–150.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F. and Collins, J.K. 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2); 386-392.
- Ewaschuk, J.B. and Dieleman, L.A. 2006. Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 12(37); 5941-5950.
- Femia, A.P., Luceri, C., Dolara, P., Giannini, A., Biggeri, A., Salvadori, M., Clune, Y., Collins, K.J., Paglierani, M. and Caderni, G. 2002. Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats, *Carcinogenesis*, 23; 1953-1960.
- Fernandes, C.F., Shahani, K.M. and Amer, M.A. 1987. Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacillic fermented dairy products. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, 46; 343-356.
- Finegold, S.M., Dowd, S.E. and Gontcharova, V. 2010. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe*, 16; 444-453.
- Frank, D.N., St Amand, A.L. and Feldman, R.A. 2007. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104; 13780-13785.
- Fuentes, S., Egert, M., Jiménez-Valera, M., Ramos-Cormenzana, A., Ruiz-Bravo, A., Smidt, H. and Monteoliva-Sanchez, M. 2008. Administration of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* affects the diversity of murine intestinal lactobacilli, but not the overall bacterial community structure. *Research Microbiology*, 159; 237-243.
- Fujimori, S., Tatsuguchi, A., Gudis, K., Kishida, T., Mitsui, K., Ehara, A., Kobayashi, T., Sekita, Y., Seo, T. and Sakamoto, C. 2007. High dose probiotic and prebiotic cotherapy for remission induction of active Crohn's disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 22(8); 1199-1204.

- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66; 365-378.
- Gbassi, G.K., Vandamme, T., Ennahar, S. and Marchioni, E. 2009. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* in an alginate matrix coated with whey proteins. *International Journal of Food Microbiology*, 129; 103-105.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. and Saurel, R. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40; 1107-1121.
- Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125; 1401-1412.
- Gill, H.S. and Guarner, F. 2004. Probiotics and human health: A clinical perspective. *Postgraduate Medical Journal*, 80; 516-526.
- Gionchetti, P., Rizzello, F., Venturi, A., Brigidi, P., Matteuzzi, D., Bazzocchi, G., Poggioli, G., Miglioli, M. and Campieri, M. 2000. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: A double-blind, placebo controlled trial. *Gastroenterology* 124; 1202-1209.
- Goossens, D., Jonkers, D., Russel, M., Thijs, A., Van den Bogaard, A., Stobberingh, E. and Stockbrügger, R. 2005. Survival of the probiotic, *L. plantarum* 299v and its effects on the faecal bacterial flora, with and without gastric acid inhibition. *Digestive and Liver Disease*, 37(4); 44-50.
- Gourbeyre, P., Denery, S. and Bodinier, M. 2011. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *Journal of Leukocyte Biology*, 89; 685-695.
- Gupta, V. and Garg, R. 2009. Probiotics. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27(3); 202-209.
- Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R. and McClements, D.J. 2006. Characterization of  $\beta$ -lactoglobulin-sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, 20; 577-585.
- Hasslöf, P., Hedberg, M., Twetman, S. and Stecksen-Blicks, C. 2010. Growth inhibition of oral mutans streptococci and candida by commercial probiotic lactobacilli - an *in vitro* study. *BMC Oral Health*, 10(18); 1-6.
- Hlivak, P., Odraska, J., Ferencik, M., Ebringer, L., Jahnova, E. and Mikes, Z. 2005. One-year application of probiotic strain *Enterococcus faecium* M-74 decreases serum cholesterol levels. *Bratislava Medical Journal*, 106(2); 67-72.

- Hsu, C.K., Liao, J.W., Chung, Y.C., Hsieh, C.P. and Chan, Y.C. 2004. Xylooligosaccharides and fructooligosaccharides affect the intestinal microbiota and precancerous colonic lesion development in rats. *Journal of Nutrition*, 134; 1523-1528.
- Hunik, J.H. and Tramper, J. 1993. Large scale production of carrageenan droplets for gel bead production, *Biotechnology Progress*, 9; 186-192.
- Hyndman, C.L., Groboillot, A.F. and Poncelet, D. 1993. Microencapsulation of *Lactococcus lactis* within cross-linked gelatin membranes, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 56; 259-263.
- Indu, P.K., Chopra, K. and Saini, A. 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15; 1-9.
- Ishikawa, H., Akedo, I., Otani, T., Suzuki, T., Nakamura, T., Takeyama, I., Ishiguro, S., Miyaoka, E., Sobue, T. and Kakizoe, T. 2005. Randomized trial of dietary fiber and *Lactobacillus casei* administration for prevention of colorectal tumors. *International Journal of Cancer*, 116; 762-767.
- Isolauri, E., Sutas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H. and Salminen, S. 2001. Probiotics: effects on immunity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2); 444-450.
- Iwamoto, T., Suzuki, N., Tanabe, K., Takeshita, T. and Hirofuji, T. 2010. Effects of probiotic *Lactobacillus salivarius* WB21 on halitosis and oral health: an open-label pilot trial. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics*, 110; 201-208.
- Jauhiainen, T., Vapaatalo, H., Poussa, T., Kyronpalo, S., Rasmussen, M. and Korpela, R. 2005. *Lactobacillus helveticus* fermented milk lowers blood pressure in hypertensive subjects in 24-h ambulatory blood pressure measurement. *American Journal of Hypertension*, 18(1); 1600-1605.
- Juarez Tomas, M.S., Saralegui Duhart, C.I., De Gregorio, P.R., Vera Pingitore, E. and Nader-Macias, M.E. 2011. Urogenital pathogen inhibition and compatibility between vaginal *Lactobacillus* strains to be considered as probiotic candidates. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 159(2); 399-406.
- Kailasapathy, K. 2006. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *Lebensmittelwissenschaft und-Technologie* 39;1221-1227.
- Kalliomaki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P. and Isolauri, E. 2001. Probiotics in primary prevention of atopic disease: A randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 357; 1076-1079.

- Khani, S., Hosseini, H.M., Taheri, M., Nourani, M.R. and Imani Fooladi, A.A. 2012. Probiotics as an alternative strategy for prevention and treatment of human diseases: A review. *Inflammation and Allergy Drug Targets*, 11(2); 79-89.
- Kiebling, G., Schneider, J. and Jahreis, G. 2002. Long term consumption of fermented dairy products over 6 months increases HDL cholesterol. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56; 843-849.
- Kim, S.J., Cho, S.Y., Kim, S.H., Song, O.J., Shin, S., Cha, D.S. and Park, H.J. 2008. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4312. *Food Science and Technology*, 41; 493-500.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H. 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria, *International Dairy Journal*, 14; 737-743.
- Kruis, W., Fric, P., Pokrotnieks, J., Lukas, M., Fixa, B., Kascak, M., Kamm, M.A., Weismueller, J., Beglinger, C., Stolte, M., Wolff, C. and Schulze, J. 2004. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut*, 53; 1617-1623.
- Laurens-Hattingh, A. and Viljoen, B.J. 2001. Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, 11; 1-17.
- Lilly, D.M. and Stillwell, R.H. 1965. Probiotics. Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147; 747-748.
- Ljungh, A. and Wadstrom, T. 2006. Lactic Acid Bacteria as probiotics. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 7; 73-89.
- Lucey, D.R., Clerici, M. and Shearer, G.M. 1996. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 9; 532-562.
- Mack, D.R. 2011. Probiotics in inflammatory bowel diseases and associated conditions. *Nutrients*, 3; 245-264.
- Makino, S., Ikegami, S., Sashihara, T., Sugano, H., Horiuchi, H., Saito, T. and Oda, M. 2006. Immunomodulatory effects of polysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL 1073R-1. *Journal of Dairy Science*, 89; 2873-2881.
- Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. and Tsakalidou, E. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16; 189-199.

- Marteau, P., Flourie, B., Pochart, P. Chastang, C., Desjeux, J.F. and Rambaud, J.C. 1990. Effect of the microbial lactase (EC 3.2.1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: An *in vivo* study on lactase deficient humans. The British Journal of Nutrition, 64; 71-79.
- Mayanagi, G., Kimura, M., Nakaya, S., Hirata, H., Sakamoto, M., Benno, Y. and Shimauchi, H. 2009. Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus salivarius* WB21-containing tablets on periodontopathic bacteria: a double blinded, placebocontrolled, randomized clinical trial. Journal of Clinical Periodontology, 36; 506-513.
- Matsumoto, M., Kibe, R., Ooga, T., Aiba, Y., Kurihara, S., Sawaki, E., Koga, Y. and Benno, Y. 2012. Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome. Scientific Reports, 2; 233.
- McFarland, L.V. 2006. Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. The American Journal of Gastroenterology, 101(4); 812-822.
- Metchnikoff, E. 1907. The prolongation of life. Optimistic studies. William Heinemann, London, United Kingdom.
- Molloy, M.J., Bouladoux, N. and Belkaid, Y. 2012. Intestinal microbiota: shaping local and systemic immune responses. Seminars in Immunology, 24; 58-66.
- Nase, L., Hatakka, K., Savilahti, E., Saxelin, M., Ponka, A., Poussa, T., Korpela, R. and 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 Researches, 35(6); 412-420.
- Oelschlaeger, TA. 2010. Mechanisms of probiotic actions. International Journal of Medical Microbiology, 300; 57-62.
- O’riordan, K., Andrews, D., Buckle, K. and Conway, P. 2001. Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. Journal of Applied Microbiology, 91; 1059-66.
- Osmanagaoglu, O., Kiran, F. and Ataoglu, H. 2010. Evaluation of in vitro Probiotic Potential of *Pediococcus pentosaceus* OZF Isolated from Human Breast Milk. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2(3); 162-174.
- Osmanagaoglu, O., Kiran, F. and Nes, I.F. 2011. A probiotic bacterium, *Pediococcus pentosaceus* OZF, isolated from human breast milk produces pediocin ACh/PA-1, African Journal of Biotechnology, 10(11); 2017-2079.

- Osmanagaoglu, O., Kiran, F., Yagci, F.G. and Gursel, I. 2013. Immunomodulatory function and *in vivo* properties of *Pediococcus pentosaceus* OZF, a promising probiotic strain, *Annals of Microbiology*, 63(4); 1311-1318.
- Quin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing, 464(7285); 59-65.
- Penders, J., Thijs, C. and van den Brandt, P.A. 2007. Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study. *Gut*, 56; 661-667.
- Percival, M. 1997. Choosing a probiotic supplement. *Clinical Nutrition Insights*, 6(1); 97-99.
- Pervan, S., Desreumaux, P. and Mercenier, A. 2003. Use of mouse models to evaluate the persistence, safety, and immune modulation capacities of lactic acid bacteria. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 10(4); 696-701.
- Picot, A. and Lacroix, C. 2003. Effects of micronization on viability and thermotolerance of probiotic freeze-dried cultures. *International Dairy of Journal*, 13; 455-462.
- Possemiers., S., Bolca, S., Grootaert, C., Heyerick, A., Decroos, K. and Dhooge, W. 2006. The prenylflavonoid isoxanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) is activated into the potent phytoestrogen 8-prenylnaringenin in vitro and in the human intestine. *Journal of Nutrition*, 136; 1862-1867.
- Ramirez-Farias, C., Slezak, K., Fuller, Z., Duncan, A., Holtrop, G. and Louis, P. 2009. Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *British Journal of Nutrition*, 101; 541-550.
- Rao, A.V., Shiwnarain, N. and Maharaj, I. 1989. Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices. *Canadian Institute of Food Science and Technology*, 22; 345-349.
- Repa, A., Wild, C., Hufnagl, K., Winkler, B., Bohle, B., Pollak, A. and Wiedermann, U. 2004. Influence of the route of sensitization on local and systemic immune responses in a murine model of type I allergy. *Clinical Experimental Immunology*, 137; 12-18.
- Roberfroid, M.B. 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional food? *American Journal of Clinical Nutrition*, 71; 1682-1687.

- Rochet, V., Rigottier-Gois, L., Levenez, F., Cadiou, J., Marteau, P., Bresson, J.L., Goupil-Feillerat, N. and Doré, J. 2008. Modulation of *Lactobacillus casei* in ileal and fecal samples from healthy volunteers after consumption of a fermented milk containing *Lactobacillus casei* DN-114 001Rif. Canadian Journal of Microbiology, 54(8); 660-667
- Rolfe, R.D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. American Society for Nutritional Sciences Annual Meeting, 130(2); 396-402.
- Rossi, M., Corradini, C., Amaretti, A., Nicolini, M., Pompei, A., Zandoni, S. and Matteuzzi, D. 2005. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. Applied and Environmental Microbiology, 71; 6150-6158.
- Sazawal, S., Hiremath, G., Dhingra, U., Malik, P., Deb, S. and Black, R.E. 2006. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. The Lancet Infectious Disease, 6; 374-382.
- Schaafsma, G., Meuling, W.J., van Dokkum, W. and Bouley, C. 1998. Effects of a milk product, fermented by *Lactobacillus acidophilus* and with fructo-oligosaccharides added, on blood lipids in male volunteers. European Journal of Clinical Nutrition, 52; 436-440.
- Serna-Cock, L. and Vallejo-Castillo, V. 2013. Probiotic encapsulation. African Journal of Microbiology Research, 7(40); 4743-4753.
- Shah, N.P., Lankaputhra, W.E.V., Britz, M. and Kyle, W.S.A. 1995. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. International Dairy Journal, 5; 515-521.
- Shah, N.P. 2000. Probiotic Bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. Journal of Dairy Science, 83(4); 894-907.
- Sheu, B.S., Cheng, H.C., Kao, A.W., Wang, S.T., Yang, Y.J., Yang, H.B. and Wu, J.J. 2006. Pretreatment with *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* containing yogurt can improve the efficacy of quadruple therapy in eradicating residual *Helicobacter pylori* infection after failed triple therapy. American Journal of Clinical Nutrition, 83(4); 864-869.
- Sheu, T.Y. and Marshall, R.T. 1993. Micro-encapsulation of Lactobacilli in calcium alginate gels. Journal of Food Science, 54; 557-561.
- Sierra, S., Lara-Villoslada, F., Sempere, L., Olivares, M., Boza, J. and Xaus, J. 2010. Intestinal and immunological effects of daily oral administration of *Lactobacillus salivarius* CECT5713 to healthy adults. Anaerobe, 16; 195-200.

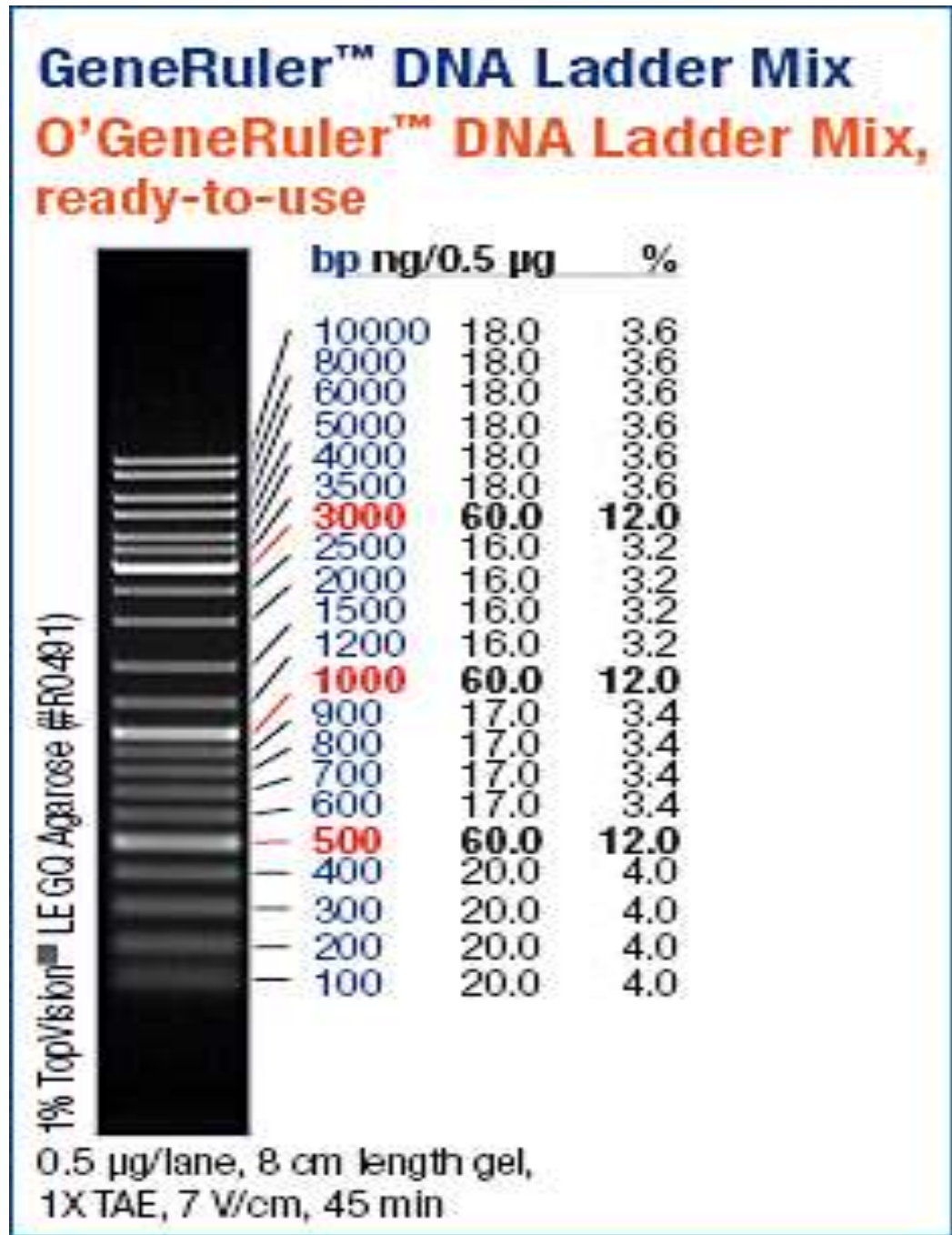
- Snydman, D.R. 2008. The safety of probiotics. *Clinical Infectious Disease*, 6(2); 104-111.
- Sokol, H., Pigneur, B. and Watterlot, L. 2008. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105; 16731-16736.
- Song, Y., Liu, C. and Finegold, S.M. 2004. Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children. *Applied and Environmental Microbiology*, 70; 6459-6465.
- Spanhaak, S., Havenaar, R. and Schaafsma, G. 1998. The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *European Journal of Clinical Nutrition*, 52; 899-907.
- Stearns, J.C., Lynch, M.D., Senadheera, D.B., Tenenbaum, H.C., Goldberg, M.B., Cvitkovitch, D.G., Croitoru, K., Moreno-Hagelsieb, G. and Neufeld, J.D. 2011. Bacterial biogeography of the human digestive tract. *Scientific Reports*, 1; 170.
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P. and Kailasapathy, K. 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62; 47-55.
- Sun, W. and Griffiths, M.W. 2000. Survival of bifidobacteria in yoghurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads, *International Journal of Food Microbiology*, 61; 17-25.
- Suwanjinda, D., Pala-or, K. and Panbangred, W. 2009. Simultaneous detection of pediocin gene and species differentiation between *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* in a one step Multiplex-overlapping PCR method. *Food Biotechnology*, 23; 179-189.
- Szajewska, H., Ruszczynski, M. and Radzikowski, A. 2006. Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Pediatrics*, 149(3); 367-372.
- Teoh, P.L., Mirhosseini, S.H., Mustafa, S., Manap, M.Y.A. 2011. Tolerance of free and encapsulated probiotics towards heat treatment and high sodium concentration, *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 9(1); 69-73.
- Truelstrup-Hansen, L., Allan-Wojtas, P.M., Jin, Y.L. and Paulson, A.T. 2002. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions, *Food Microbiology*, 19; 35-45.
- Uludag, H., De Vos, P. and Tresco, P.A. 2000. Technology of mammalian cell encapsulation, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 42; 29-64.

- Vanderberg, P.A. 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews, 12; 221-238.
- Van Nimwegen, F.A., Penders, J. and Stobberingh, E.E. 2011. Mode and place of delivery, gastrointestinal microbiota, and their influence on asthma and atopy. Allergy and Clinical Immunology, 128; 948-955.
- Viljanen, M., Savilahti, E., Haahtela, E., Juntunen-Backman, K., Korpela, R., Poussa, T., Tuure, T. and Kuitunen, M. 2005. Probiotics in the treatment of atopic eczema/dermatitis syndrome in infants: A double-blind placebo-controlled trial. Allergy, 60; 494-500.
- Vitor, J.M.B. and Vale, F.F. 2010. Alternative therapies for *Helicobacter pylori*: probiotics and phytomedicine. Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology, 2; 152-164.
- Waldram, A., Holmes, E., Wang, Y., Rantalainen, M., Wilson, I. and Tuohy, K. 2009. Topdown systems biology modelling of host metabotype-microbiome associations in obese rodents. Journal of Proteome Research, 8(5):2361-2375.
- Wassenaar, T.M. and Klein, G. 2008. Safety aspects and implications of regulation of probiotic bacteria in food and food supplements. Journal of Food Protection, 71(8); 1734-1741.
- Wilhelm, S.M., Johnson, J.L. and Kale-Pradhan, P.B. 2011. Treating Bugs with Bugs: The Role of Probiotics as Adjunctive Therapy for *Helicobacter pylori*. The Annals of Pharmacotherapy, 45(10); 960-966.
- Yang, Y.J., Chuang, C.C., Yang, H.B., Lu, C.C. and Sheu, B.S. 2012. *Lactobacillus acidophilus* ameliorates H. pylori-induced gastric inflammation by inactivating the Smad7 and NFκB pathways. BMC Microbiology, 12; 38-46.
- Zhang, J.W., Du, P., Gao, J., Yang, B.R., Fang, W.J. and Ying, C.M. 2012. Preoperative probiotics decrease postoperative infectious complications of colorectal cancer. The American Journal of Medical Sciences, 343(3);199-205.

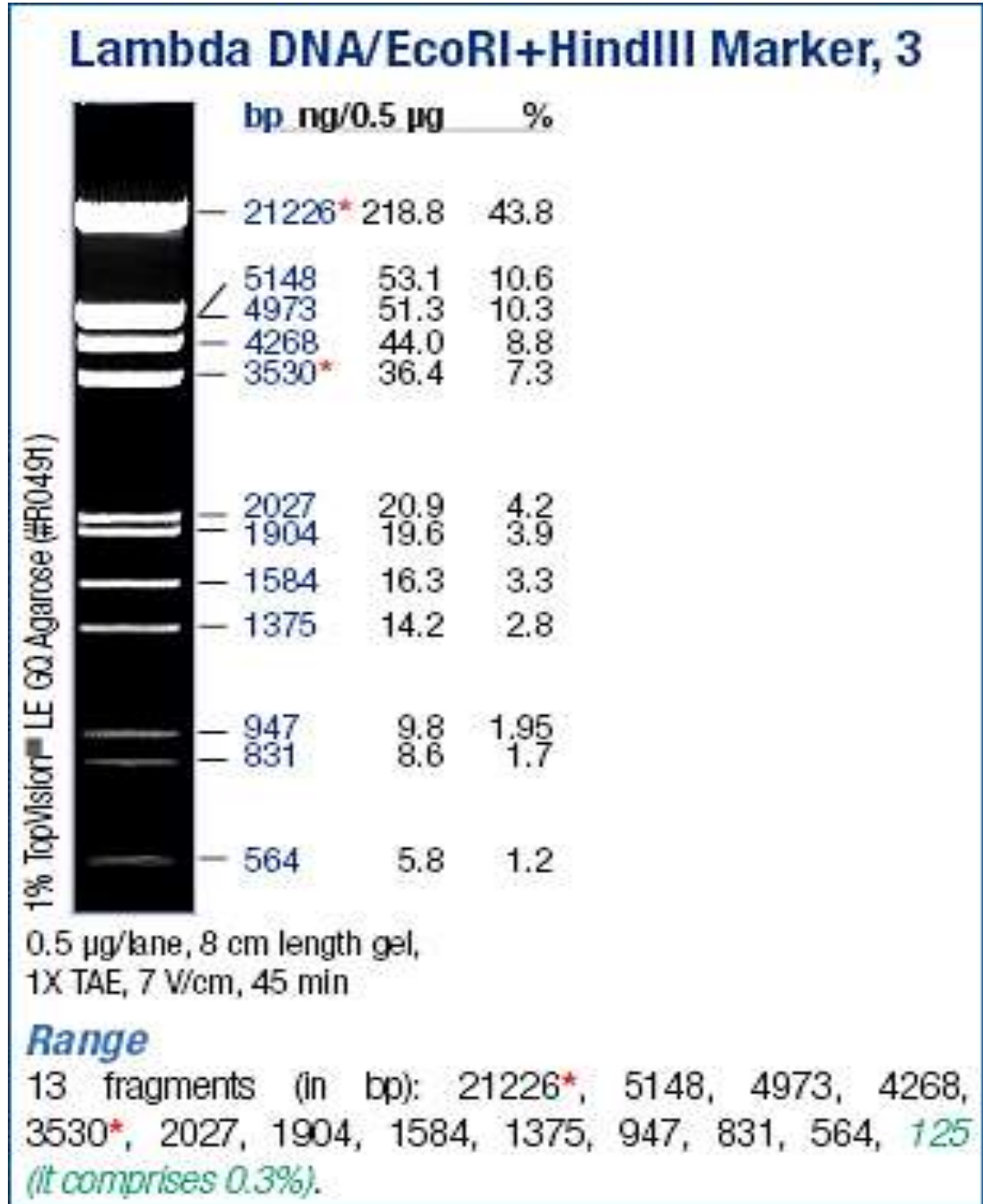
## **EKLER**

|                                                         |    |
|---------------------------------------------------------|----|
| EK 1 Moleküler markörler .....                          | 64 |
| EK 2 Besiyerleri ve Tamponlar.....                      | 66 |
| EK 3 Kimyasallar.....                                   | 68 |
| EK 4 DNA izolasyon kiti .....                           | 69 |
| EK 5 Klonlama kit protokolü.....                        | 72 |
| EK 6 Topo-Ta kitinde kullanılan vektörün haritası ..... | 79 |

## EK 1 Moleküler markörler



Şekil 1. Gene-mixed ruler DNA markörü (Fermentas, Fransa)



Şekil 2. λDNA/EcoRI-Hind III markörü (Fermentas, Fransa)

## EK 2 Besiyerleri ve Tamponlar

### DYT

| Kompozisyon           | g/100ml   |
|-----------------------|-----------|
| Tryptone              | 1.6       |
| yeast extract         | 1.0       |
| NaCl                  | 0.5       |
| 10N NaOH              | 2.5 damla |
| pH: 7.0               |           |
| Buzdolabında saklanır |           |

### SOC Medium:

| Composition       |        |
|-------------------|--------|
| Bacto-tryptone    | 2%     |
| Yeast Extract     | 0.5%   |
| NaCl              | 10 mM  |
| KCl               | 2.5 mM |
| MgCl <sub>2</sub> | 10 mM  |
| MgSO <sub>4</sub> | 10 ml  |
| Glucose           | 20 mM  |

## 01M FOSFAT TAMPONU

0.5L, 1M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ( $174.18\text{g mol}^{-1}$ ) = 87.09g

0.5L, 1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $136.09\text{g mol}^{-1}$ ) = 68.045g

**Preparation of 0.1 M Potassium Phosphate Buffer at 25°C**

| pH  | VOLUME OF 1 M<br>$\text{K}_2\text{HPO}_4$ (ml) | VOLUME OF 1 M<br>$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (ml) |
|-----|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 5.8 | 8.5                                            | 91.5                                           |
| 6.0 | 13.2                                           | 86.8                                           |
| 6.2 | 19.2                                           | 80.8                                           |
| 6.4 | 27.8                                           | 72.2                                           |
| 6.6 | 38.1                                           | 61.9                                           |
| 6.8 | 49.7                                           | 50.3                                           |
| 7.0 | 61.5                                           | 38.5                                           |
| 7.2 | 71.7                                           | 28.3                                           |
| 7.4 | 80.2                                           | 19.8                                           |
| 7.6 | 86.6                                           | 13.4                                           |
| 7.8 | 90.8                                           | 9.2                                            |
| 8.0 | 94.0                                           | 6.0                                            |

Son hacim 1 lt'ye tamamlanır

### EK 3 Kimyasallar

| Kimyasallar                             | Üretici Firma |
|-----------------------------------------|---------------|
| PBS (phosphate buffered saline) tamponu | THERMO        |
| Sodyum aljinat                          | SIGMA         |
| Peynir altı suyu proteinleri            | GMC           |
| Pepsin                                  | SIGMA         |
| Pankreatin                              | SIGMA         |
| Safra tuzu                              | SIGMA         |
| Agaroz                                  | SIGMA         |
| NucleoSpin Soil kiti                    | MACHERY NAGEL |
| Brilliant II SYBR® Green                | SYBR® Green   |
| dNTP                                    | FERMENTAS     |
| Taq DNA polimeraz                       | FERMENTAS     |
| Dye Front                               | FERMENTAS     |
| EtBr                                    | SIGMA         |
| TOPO TA klonlama kit                    | INVITROGEN    |
| MRS broth                               | CONDA         |
| Agar                                    | CONDA         |

## EK 4 DNA İZOLASYON KİTİ (NUCLEOSPIN SOIL-MACHEREY NAGEL)

### 1 Prepare sample

See section 2.4 and 2.5 for more information on the amount of starting material and the choice of lysis buffer. See section 2.7 for the repeated extraction of a sample to improve DNA yield.

Transfer **250–500 mg** fresh **sample material** to a **NucleoSpin® Bead Tube** containing the ceramic beads.

**Important:** Do not fill the tube higher than the **1 mL** mark.

Add **700 µL** Buffer SL1 or Buffer SL2.

*Note for very dry material:* If the sample material soaks up too much lysis buffer, fill the NucleoSpin® Bead Tube up to the 1.5 mL mark with fresh lysis buffer.

*Note for very wet material:* Remove excess liquid before addition of lysis buffer, if necessary after spinning down the sample.



**250–500 mg**  
**sample**  
  
**+ 700 µL**  
**SL1 or SL2**

### 2 Adjust lysis conditions

Add **150 µL** Enhancer SX and close the cap.

*Note:* Enhancer SX ensures the highest possible DNA yield. It can, however, also promote the release of humic acids. See section 2.5 on how to lower the volume or omit the buffer entirely in order to increase DNA purity.



**+ 150 µL SX**

### 3 Sample lysis

See section 2.6 for more information on homogenization methods (e.g., FastPrep®-24 instrument, Vortex adapter).

Attach the NucleoSpin® Bead Tubes **horizontally** to a vortexer, for example, by taping or using a special adapter.

Vortex the samples at **full speed** and **room temperature** (18–25 °C) for **5 min**.



**Vortex**  
**RT, 5 min**

### 4 Precipitate contaminants

Centrifuge for **2 min** at **11,000 x g** to eliminate the foam caused by the detergent.

*Note:* The clear supernatant can be transferred to a new collection tube (not provided) prior to the following precipitation. This might result in more consistent yields from prep to prep and is highly recommended for carbonate containing samples. See also section 2.7 for repeated extraction of a sample to improve DNA yield.

Add **150 µL** Buffer SL3 and vortex for **5 s**.

Incubate for **5 min** at **0–4 °C**.

Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**.



**11,000 x g,**  
**2 min**  
  
**+ 150 µL SL3**  
  
**Vortex 5 s**  
  
**0–4 °C, 5 min**  
  
**11,000 x g,**  
**1 min**

## 5 Filter lysate

Place a **NucleoSpin® Inhibitor Removal Column** (red ring) in a Collection Tube (2 mL, lid).

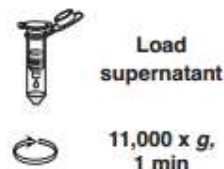
Load up to **700 µL** clear supernatant of step 4 onto the filter.

Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**.

*Note: With very wet samples (e.g., sediments) the volume of clear supernatant of step 4 can exceed 700 µL significantly. In this case transfer the NucleoSpin® Inhibitor Removal Column to a new collection tube (not provided) and load the remaining supernatant. Centrifuge for 1 min at 11,000 x g. Combine the flow-throughs.*

Discard the NucleoSpin® Inhibitor Removal Column.

If a pellet is visible in the flow-through, transfer the clear supernatant to a new collection tube (not provided).



## 6 Adjust binding conditions

Add **250 µL Buffer SB** and close the lid.

Vortex for **5 s**.



## 7 Bind DNA

Place a **NucleoSpin® Soil Column** (green ring) in a Collection Tube (2 mL).

Load **550 µL sample** onto the column.

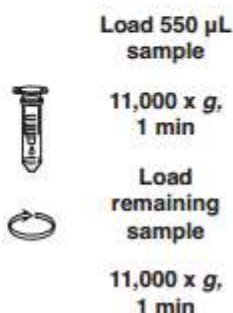
Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**.

Discard flow-through and place the column back into the collection tube.

Load the **remaining sample** onto the column.

Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**.

Discard flow-through and place the column back into the collection tube.



## 8 Wash and dry silica membrane

### 1<sup>st</sup> wash

Add **500 µL Buffer SB** to the NucleoSpin® Soil Column.

Centrifuge for **30 s** at **11,000 x g**.

Discard flow-through and place the column back into the collection tube.

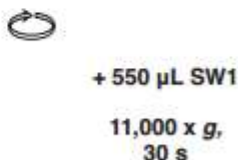


### 2<sup>nd</sup> wash

Add **550 µL Buffer SW1** to the NucleoSpin® Soil Column.

Centrifuge for **30 s** at **11,000 x g**.

Discard flow-through and place the column back into the collection tube.



### 3<sup>rd</sup> wash

Add **700 µL Buffer SW2** to the NucleoSpin® Soil Column.

Close the lid and vortex for **2 s**. Centrifuge for **30 s** at **11,000 x g**. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.

### 4<sup>th</sup> wash

Add **700 µL Buffer SW2** to the NucleoSpin® Soil Column.

Close the lid and vortex for **2 s**. Centrifuge for **30 s** at **11,000 x g**. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.

*Note: The same collection tube is used throughout the entire washing procedure to reduce plastic waste. If new collection tubes are to be used for each step, see section 6.2 for ordering information.*

+ 700 µL SW2

Vortex 2 s

11,000 x g,  
30 s



+ 700 µL SW2

Vortex 2 s

11,000 x g,  
30 s



## 9 Dry silica membrane

Centrifuge for **2 min** at **11,000 x g**.

*If for any reason, the liquid in the collection tube has touched the NucleoSpin® Soil Column after the drying step, discard flow-through and centrifuge again.*

11,000 x g,  
2 min



## 10 Elute DNA

Place the NucleoSpin® Soil Column into a new microcentrifuge tube (not provided).

Add **30 µL** (for high concentration), **50 µL** (for medium concentration and yield), or **100 µL** (for high yield) **Buffer SE** to the column.

Do not close the lid and incubate for **1 min** at room temperature (18–25 °C). Close the lid and centrifuge for **30 s** at **11,000 x g**.

*Note: Quantify DNA not only by UV-VIS but also run an agarose gel to verify yield and DNA quality (see section 2.9 for more information).*

30–100 µL  
SE

RT, 1 min

11,000 x g,  
30 s



## EK 5 Klonlama kit protokolü (TOPO-TA, PCR2.1, INVITROGEN)

1

### Produce PCR Products

#### Introduction

It is important to properly design your PCR primers to ensure that you obtain the product you need for your studies. After deciding on a PCR strategy and synthesizing the primers, you are ready to produce your PCR product.  
**Remember that your PCR product will have single 3' adenine overhangs.**



#### Note

Do not add 5' phosphates to your primers for PCR. The PCR product synthesized will not ligate into pCR™2.1-TOPO® vector or pCR™II-TOPO® vector.

#### Materials supplied by the user

- *Taq* polymerase
- Thermocycler
- DNA template and primers for PCR product

#### Polymerase mixtures

If you wish to use a mixture containing *Taq* polymerase and a proofreading polymerase, *Taq* must be used in excess of a 10:1 ratio to ensure the presence of 3' A-overhangs on the PCR product.

If you use polymerase mixtures that do not have enough *Taq* polymerase or a proofreading polymerase only, add 3' A-overhangs using the method on page 19.

#### Produce PCR products

1. Set up the following 50 µL PCR reaction. Use less DNA if you are using plasmid DNA as a template and more DNA if you are using genomic DNA as a template. Use the cycling parameters suitable for your primers and template. Be sure to include a 7–30 minute extension at 72°C after the last cycle to ensure that all PCR products are full length and 3' adenylated.

|                                   |                                |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| DNA Template                      | 10–100 ng                      |
| 10X PCR Buffer                    | 5 µL                           |
| 50 mM dNTPs                       | 0.5 µL                         |
| Primers (100–200 ng each)         | 1 µM each                      |
| Water                             | add to a final volume of 49 µL |
| <i>Taq</i> Polymerase (1 unit/µL) | 1 µL                           |
| Total Volume                      | 50 µL                          |

2. Check the PCR product by agarose gel electrophoresis. You should see a single, discrete band. If you do not see a single band, refer to the following **Note**.

2

### Set Up the TOPO® Cloning Reaction

#### Introduction

Once you have produced the desired PCR product, you are ready to TOPO®-clone it into the pCR™2.1-TOPO® or pCR™II-TOPO® vector and transform the recombinant vector into competent *E. coli*. It is important to have everything you need set up and ready to use to ensure that you obtain the best possible results. We suggest that you read this section and the sections detailing transformation of competent cells (pages 6–10) before beginning. If this is the first time you have TOPO®-cloned, perform the control reactions on pages 14–15 in parallel with your samples.



#### Note

We have found that including salt (200 mM NaCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>) in the TOPO® Cloning reaction increases the number of transformants 2- to 3-fold. We have also observed that in the presence of salt, incubation times of greater than 5 minutes can also increase the number of transformants. This is in contrast to earlier experiments **without salt** where the number of transformants decreases as the incubation time increases beyond 5 minutes.

Inclusion of salt allows for longer incubation times because it prevents topoisomerase I from rebinding and potentially nicking the DNA after ligating the PCR product and dissociating from the DNA. The result is more intact molecules leading to higher transformation efficiencies.



### Important

Because of the above results, we recommend adding salt to the TOPO® Cloning reaction. A stock salt solution is provided in the kit for this purpose. **Note that you must dilute the TOPO® Cloning reaction before transforming electrocompetent cells (see the following sections).** Read the following information carefully.

### Transform chemically competent *E. coli*

For TOPO® Cloning and transformation into chemically competent *E. coli*, adding sodium chloride and magnesium chloride to a final concentration of 200 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> in the TOPO® Cloning reaction increases the number of colonies over time. A Salt Solution (1.2 M NaCl; 0.06 M MgCl<sub>2</sub>) is provided to adjust the TOPO® Cloning reaction to the recommended concentration of NaCl and MgCl<sub>2</sub>.

### Transform electrocompetent *E. coli*

For TOPO® Cloning and transformation of electrocompetent *E. coli*, salt must also be included in the TOPO® Cloning reaction, but the amount of salt **must be reduced** to 50 mM NaCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> in order to prevent arcing. After performing the TOPO® Cloning reaction, and prior to electroporation, dilute the reaction 4-fold to achieve the proper salt concentration.

### Perform the TOPO® Cloning reaction

1. Mix the reaction gently and incubate for **5 minutes** at room temperature (22–23°C).  
**Note:** For most applications, 5 minutes will yield sufficient colonies for analysis. Depending on your needs, the length of the TOPO®-cloning reaction can be varied from 30 seconds to 30 minutes. For routine subcloning of PCR products, 30 seconds may be sufficient. For large PCR products (greater than 1 kb) or if you are TOPO®-cloning a pool of PCR products, increasing the reaction time will yield more colonies.
2. Place the reaction on ice and proceed to **General Guidelines for Transforming Competent Cells** on page 5.  
**Note:** You may store the TOPO® Cloning reaction at –20°C overnight.



### Note

TOPO® TA Cloning® Kits are optimized to work with One Shot® Competent *E. coli* available from Life Technologies Corporation. Use of other competent cells may require further optimization.

Performing the control TOPO® Cloning reaction is recommended as this control when used with the supplied protocol will demonstrate high cloning efficiencies. Additionally, transforming a control plasmid is highly recommended to confirm transformation efficiencies when using alternative competent cells not supplied by Life Technologies.

### Set Up the TOPO® Cloning reaction

The following table describes how to set up your TOPO® Cloning reaction (6 µL) for eventual transformation into either chemically competent or electrocompetent TOP10 or chemically competent DH5α™-T1<sup>R</sup>, Mach1™-T1<sup>R</sup>, or TOP10F' One Shot® *E. coli*. Additional information on optimizing the TOPO® Cloning reaction for your needs can be found on page 13.

**Note:** The red color of the TOPO® vector solution is normal and is used to visualize the solution.

| Reagent*            | Volume                        |
|---------------------|-------------------------------|
| Fresh PCR product   | 0.5–4 µL                      |
| Salt Solution       | 1 µL                          |
| Water               | add to a total volume of 5 µL |
| TOPO® vector        | 1 µL                          |
| <b>Final Volume</b> | <b>6 µL</b>                   |

\*Store all reagents at –20°C when finished. Salt solutions and water can be stored at room temperature or 4°C.

### Perform the TOPO® Cloning reaction

1. Mix the reaction gently and incubate for **5 minutes** at room temperature (22–23°C).  
**Note:** For most applications, 5 minutes will yield sufficient colonies for analysis. Depending on your needs, the length of the TOPO®-cloning reaction can be varied from 30 seconds to 30 minutes. For routine subcloning of PCR products, 30 seconds may be sufficient. For large PCR products (greater than 1 kb) or if you are TOPO®-cloning a pool of PCR products, increasing the reaction time will yield more colonies.
2. Place the reaction on ice and proceed to **General Guidelines for Transforming Competent Cells** on page 5.  
**Note:** You may store the TOPO® Cloning reaction at –20°C overnight.



#### Note

TOPO® TA Cloning® Kits are optimized to work with One Shot® Competent *E. coli* available from Life Technologies Corporation. Use of other competent cells may require further optimization.

Performing the control TOPO® Cloning reaction is recommended as this control when used with the supplied protocol will demonstrate high cloning efficiencies.

Additionally, transforming a control plasmid is highly recommended to confirm transformation efficiencies when using alternative competent cells not supplied by Life Technologies.

## 3

### General Guidelines for Transforming Competent Cells

#### Introduction

After performing the TOPO® Cloning reaction, transform your pCR™2.1-TOPO® or pCR™II-TOPO® construct into the competent *E. coli*.

General guidelines for transformation are provided below. For transformation into competent *E. coli* supplied with your kit, refer to **Transform One Shot® Mach1™-T1® Competent Cells** (pages 6–7) or **Transform One Shot® DH5α™-T1®, TOP10, and TOP10F® Competent Cells** (pages 8–10) depending on the competent *E. coli* you wish to transform.

To transform another competent strain, refer to the manufacturer's instructions.

#### Select a One Shot® chemical transformation protocol

Two protocols are provided to transform One Shot® chemically competent *E. coli*. Consider the following factors when choosing the protocol that best suits your needs.

| If you wish to...                                                       | Then use the...                          |
|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| maximize the number of transformants                                    | regular chemical transformation protocol |
| clone large PCR products (greater than 1000 bp)                         |                                          |
| use kanamycin as the selective agent (see the following Important Note) |                                          |
| obtain transformants as quickly as possible                             | rapid chemical transformation protocol   |



#### Important

If you will be using kanamycin as the selective agent for chemical transformation, use the regular chemical transformation protocol. The rapid chemical transformation protocol is only suitable for transformations using ampicillin selection.

## Transform One Shot® Mach1™-T1<sup>R</sup> Competent Cells

### Introduction

Protocols to transform One Shot® Mach1™-T1<sup>R</sup> chemically competent *E. coli* are provided in this section. If you are transforming cells other than Mach1™-T1<sup>R</sup> cells, refer to the section entitled **Transform One Shot® DH5α™-T1<sup>R</sup>, TOP10, and TOP10F<sup>+</sup> Competent Cells** (pages 8–10). If using other competent cells, follow manufacturer's instructions.



### Note

The Mach1™-T1<sup>R</sup> strain allows you to visualize colonies 8 hours after plating on ampicillin selective plates. If you are using kanamycin selection, you will need to incubate plates overnight in order to visualize colonies.

With the Mach1™-T1<sup>R</sup> strain, you may also prepare plasmid DNA 4 hours after inoculating a single, overnight-grown colony. Note that you will get sufficient growth of transformed cells within 4 hours in ampicillin or kanamycin selective media.

### Required materials

*Components required but not supplied:*

- The TOPO® Cloning reaction from **Perform the TOPO® Cloning Reaction**, step 2 on page 4
- LB plates containing 50 µg/mL ampicillin or 50 µg/mL kanamycin
- 40 mg/mL X-gal in dimethylformamide (DMF)
- 42°C water bath
- 37°C shaking and non-shaking incubator
- General microbiological supplies (e.g. plates, spreaders)

*Components supplied with the kit:*

- S.O.C. medium

### Prepare for transformation

For each transformation, you will need one vial of competent cells and two selective plates.

- Equilibrate a water bath to 42°C.
- Warm the vial of S.O.C. medium from Box 2 to room temperature.
- Warm selective plates at 37°C for 30 minutes (see the following Important Note).
- Spread 40 µL of 40 mg/mL X-gal on each LB plate and incubate at 37°C until ready for use.
- Thaw on ice 1 vial of One Shot® cells for each transformation.

### One Shot® chemical transformation protocol

For optimal growth of Mach1™-T1<sup>R</sup> *E. coli* cells, it is essential that selective plates are prewarmed to 37°C prior to spreading.

1. Add 2 µL of the TOPO® Cloning reaction from **Perform the TOPO® Cloning Reaction**, step 2 on page 4 into a vial of One Shot® Chemically Competent *E. coli* and mix gently. **Do not mix by pipetting up and down.**
2. Incubate on ice for 5–30 minutes.  
**Note:** Longer incubations on ice do not seem to affect transformation efficiency. The length of the incubation is at the user's discretion.
3. Heat-shock the cells for 30 seconds at 42°C without shaking.
4. Immediately transfer the tubes to ice.
5. Add 250 µL of room temperature S.O.C. medium.
6. Cap the tube tightly and shake the tube horizontally (200 rpm) at 37°C for 1 hour.
7. Spread 10–50 µL from each transformation on a *prewarmed* selective plate. To ensure even spreading of small volumes, add 20 µL of S.O.C. medium. We recommend that you plate two different volumes to ensure that at least one plate will have well-spaced colonies.
8. Incubate plates at 37°C. If you are using ampicillin selection, visible colonies should appear within 8 hours, and blue/white screening can be performed after 12 hours. For kanamycin selection, incubate plates overnight.
9. An efficient TOPO® Cloning reaction should produce several hundred colonies. Pick ~10 white or light blue colonies for analysis (see **Analyze Positive Clones** on page 11). Do not pick dark blue colonies.

### Rapid One Shot® chemical transformation protocol

An alternative protocol is provided below for rapid transformation of One Shot® Mach1™-T1<sup>R</sup> cells. This protocol is **only** recommended for transformations using **ampicillin** selection. For more information on selecting a transformation protocol, refer to page 5.

**Note:** Warm LB plates containing ampicillin to 37°C prior to spreading.

1. Add 4 µL of the TOPO® Cloning reaction from **Perform the TOPO® Cloning Reaction**, step 2, page 4 into a vial of One Shot® Chemically Competent *E. coli* and mix gently. **Do not mix by pipetting up and down.**
2. Incubate on ice for 5 minutes.
3. Spread 50 µL of cells on a prewarmed LB plate containing 50–100 µg/mL ampicillin and incubate overnight at 37°C.

An efficient TOPO® Cloning reaction should produce several hundred colonies. Pick ~10 white or light blue colonies for analysis (see **Analyze Positive Clones**, page 11). Do not pick dark blue colonies.

## 5

### Transform One Shot® DH5α™-T1<sup>R</sup>, TOP10, and TOP10F<sup>+</sup> Competent Cells

#### Introduction

Protocols to transform One Shot® DH5α™-T1<sup>R</sup>, TOP10, and TOP10F<sup>+</sup> competent *E. coli* are provided in this section. Both chemical transformation and electroporation protocols are provided. If you are transforming Mach1™-T1<sup>R</sup> cells, refer to the section entitled **Transform One Shot® Mach1™-T1<sup>R</sup> Competent Cells** (pages 6–7). If using other competent cells, follow manufacturer's instructions.

#### Required materials

*Components required but not supplied:*

- The TOPO® Cloning reaction from **Perform the TOPO® Cloning Reaction**, step 2 on page 4
- LB plates containing 50 µg/mL ampicillin or 50 µg/mL kanamycin
- 40 mg/mL X-gal in dimethylformamide (DMF)
- 100 mM IPTG in water (for use with TOP10F<sup>+</sup>)
- 15-mL snap-cap plastic culture tubes (sterile) (electroporation only)
- 42°C water bath
- 37°C shaking and non-shaking incubator
- General microbiological supplies (e.g. plates, spreaders)

*Components supplied with the kit:*

- S.O.C. medium

#### Prepare for transformation

For each transformation, you will need one vial of competent cells and two selective plates.

- Equilibrate a water bath to 42°C (for chemical transformation) or set up your electroporator.
- Warm the vial of S.O.C. medium from Box 2 to room temperature.
- Warm selective plates at 37°C for 30 minutes (see **Important Note**, page 9).
- Spread 40 µL of 40 mg/mL X-gal on each LB plate and incubate at 37°C until ready for use.
- For TOP10F<sup>+</sup> cells, spread 40 µL of 100 mM IPTG in addition to X-gal on each LB plate and incubate at 37°C until ready for use. IPTG is required for blue/white screening.
- Thaw *on ice* 1 vial of One Shot® cells for each transformation.

### One Shot® chemical transformation protocol

1. Add 2 µL of the TOPO® Cloning reaction from **Perform the TOPO® Cloning Reaction**, step 2 on page 4 into a vial of One Shot® Chemically Competent *E. coli* and mix gently. **Do not mix by pipetting up and down.**
2. Incubate on ice for 5–30 minutes.  
**Note:** Longer incubations on ice do not seem to affect transformation efficiency. The length of the incubation is at the user's discretion.
3. Heat-shock the cells for 30 seconds at 42°C without shaking.
4. Immediately transfer the tubes to ice.
5. Add 250 µL of room temperature S.O.C. medium.
6. Cap the tube tightly and shake the tube horizontally (200 rpm) at 37°C for 1 hour.
7. Spread 10–50 µL from each transformation on a prewarmed selective plate and incubate overnight at 37°C. To ensure even spreading of small volumes, add 20 µL of S.O.C. medium. We recommend that you plate two different volumes to ensure that at least one plate will have well-spaced colonies.
8. An efficient TOPO® Cloning reaction should produce several hundred colonies. Pick ~10 white or light blue colonies for analysis (see **Analyze Positive Clones** on page 11). Do not pick dark blue colonies.

### Rapid One Shot® chemical transformation protocol

An alternative protocol is provided below for rapid transformation of One Shot® chemically competent *E. coli*. This protocol is **only** recommended for transformations using ampicillin selection. For more information on selecting a transformation protocol, see page 5.

**Note:** It is essential that LB plates containing ampicillin are pre-warmed prior to spreading.

1. Add 4 µL of the TOPO® Cloning reaction from **Perform the TOPO® Cloning Reaction**, step 2 on page 4 into a vial of One Shot® Chemically Competent *E. coli* and mix gently. **Do not mix by pipetting up and down.**
2. Incubate on ice for 5 minutes.
3. Spread 50 µL of cells on a pre-warmed LB plate containing 50–100 µg/mL ampicillin and incubate overnight at 37°C.
4. An efficient TOPO® Cloning reaction should produce several hundred colonies. Pick ~10 white or light blue colonies for analysis (see **Analyze Positive Clones** on page 11). Do not pick dark blue colonies.

### One Shot® electroporation protocol

1. Add 18 µL of water to 6 µL of the TOPO® Cloning reaction from **Perform the TOPO® Cloning Reaction**, step 2 on page 4. Mix gently.  
**Note:** The TOPO® Cloning reaction must be diluted in this step to prevent arcing.
2. Transfer 2 µL of the diluted TOPO® Cloning reaction (from step 1 of this procedure) into a vial of One Shot® Electrocompetent *E. coli* and mix gently. **Do not mix by pipetting up and down.**
3. Carefully transfer the solution into a 0.1-cm cuvette to avoid formation of bubbles.
4. Electroporate your samples using your own protocol and your electroporator.  
**Note:** If you have problems with arcing, see the following Note.
5. Immediately add 250 µL of room temperature S.O.C. medium.
6. Transfer the solution into a 15-mL snap-cap tube (e.g. Falcon) and shake for at least 1 hour at 37°C to allow expression of the antibiotic resistance genes.
7. Spread 10–50 µL from each transformation onto a pre-warmed selective plate and incubate overnight at 37°C. To ensure even spreading of small volumes, add 20 µL of S.O.C. medium. We recommend that you plate two different volumes to ensure that at least one plate will have well-spaced colonies.
8. An efficient TOPO® Cloning reaction should produce several hundred colonies. Pick ~10 white or light blue colonies for analysis (see **Analyze Positive Clones** on page 11). Do not pick dark blue colonies.

## Analyze Transformants

### Analyze positive clones

1. Take 2–6 white or light blue colonies and culture them overnight in LB medium containing 50 µg/mL ampicillin or 50 µg/mL kanamycin.  
**Note:** If you transformed One Shot® Mach1™-T1<sup>®</sup> competent *E. coli*, you may inoculate overnight-grown colonies and culture them for 4 hours in **pre-warmed** LB medium containing 50 µg/mL ampicillin or 50 µg/mL kanamycin before isolating the plasmid. For optimal results, we recommend inoculating as much of a single colony as possible.
2. Isolate plasmid DNA using PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit (supplied with Cat. nos. K4500-02 and K4510-02 or available separately, see page 23). The plasmid isolation protocol is included in the manual supplied with the PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit and is also available from [www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com). Other kits for plasmid DNA purification are also suitable for use.
3. Analyze the plasmids by restriction analysis to confirm the presence and correct orientation of the insert. Use a **restriction** enzyme or a combination of enzymes that cut once in the vector and once in the insert.

### Sequencing

You may sequence your construct to confirm that your gene is cloned in the correct orientation. The M13 Forward (–20) and M13 Reverse primers are included to help you sequence your insert. Refer to the maps on page 21 (pCR™2.1-TOPO® vector) or page 22 (pCR™II-TOPO® vector) for sequence surrounding the TOPO® TA Cloning® site. For the full sequence of either vector, visit [www.lifetechnologies.com/support](http://www.lifetechnologies.com/support) or contact Technical Support (page 24).

### Analyze transformants by PCR

You may wish to use PCR to directly analyze positive transformants. For PCR primers, use either the M13 Forward (–20) or the M13 Reverse primer and a primer that hybridizes within your insert. If you are using this technique for the first time, we recommend performing restriction analysis in parallel. Artifacts may be obtained because of mispriming or contaminating template. The protocol is provided below for your convenience. Other protocols are suitable.

#### Materials Needed

PCR SuperMix High Fidelity (see page 23)

Appropriate forward and reverse PCR primers (20 µM each)

#### Procedure

1. For each sample, aliquot 48 µL of PCR SuperMix High Fidelity into a 0.5-mL microcentrifuge tube. Add 1 µL each of the forward and reverse PCR primer.
2. Pick 10 colonies and resuspend them individually in 50 µL of the PCR cocktail from step 1 of this procedure. Don't forget to make a patch plate to preserve the colonies for further analysis.
3. Incubate the reaction for 10 minutes at 94°C to lyse the cells and inactivate nucleases.
4. Amplify for 20–30 cycles.
5. For the final extension, incubate at 72°C for 10 minutes. Store at 4°C.
6. Visualize by agarose gel electrophoresis.



### Important

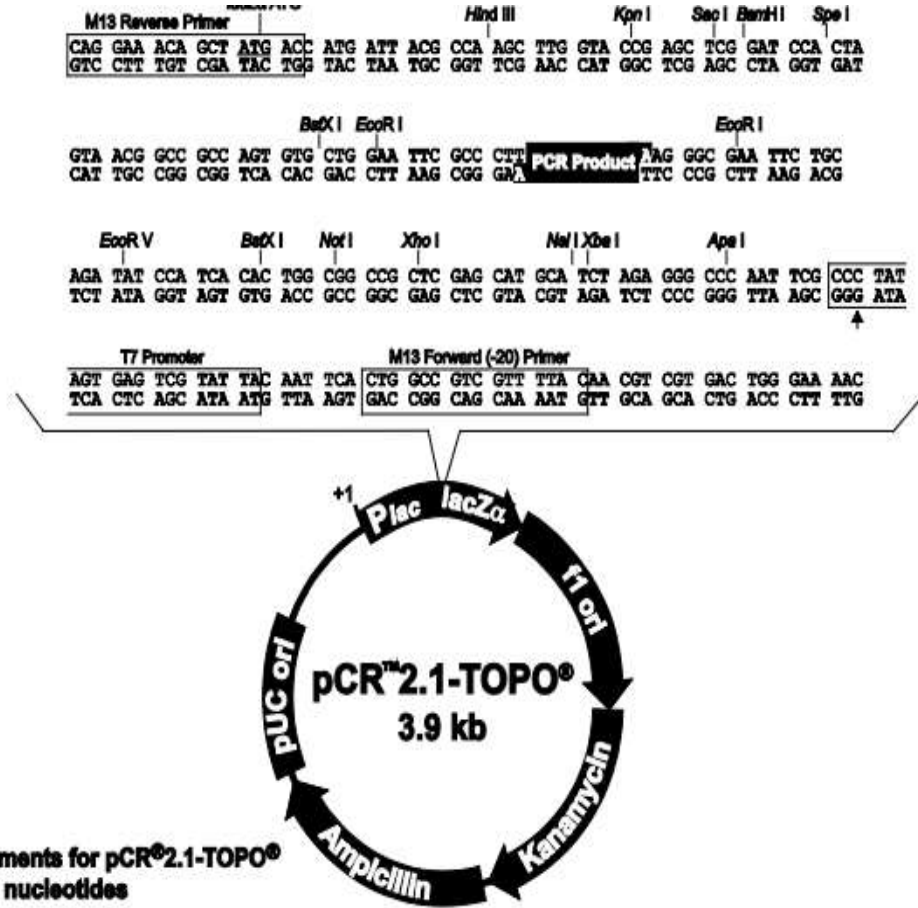
If you have problems obtaining transformants or the correct insert, perform the control reactions described on pages 14–15 to help troubleshoot your experiment.

### Long-term storage

After identifying the correct clone, be sure to prepare a glycerol stock for long term storage. We recommend that you store a stock of plasmid DNA at –20°C.

1. Streak the original colony out on LB plates containing 50 µg/mL ampicillin or 50 µg/mL kanamycin.
2. Isolate a single colony and inoculate into 1–2 mL of LB containing 50 µg/mL ampicillin or kanamycin.
3. Grow until culture reaches stationary phase.
4. Mix 0.85 mL of culture with 0.15 mL of sterile glycerol and transfer to a cryovial.
5. Store at –80°C.

## EK 6 TOPO-TA Kitinde Kullanılan Vektörün Haritası



**Comments for PCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>**  
3931 nucleotides

LacZα fragment: bases 1-547  
M13 reverse priming site: bases 205-221  
Multiple cloning site: bases 234-357  
T7 promoter/priming site: bases 364-383  
M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406  
f1 origin: bases 548-985  
Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113  
Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991  
pUC origin: bases 3136-3809

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : Mohamed MOKRANI

**Doğum Yeri** : Tunus

**Doğum Tarihi** : 04/08/1985

**Yabancı Dili** : Fransızca, İngilizce

### **Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)**

Lise : Taha Husein Lisesi

Lisans : Elmanar Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Hücresel ve Biyoteknoloji Anabilim Dalı, 2006-2010.

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (Şubat 2012, Mayıs 2014)

### **Uluslararası Kongre:**

**2012:** Kiran F, Onlu H, Acar SI, **Mokrani M**, Maden BH and Osmanagaoglu O. Differentiation of *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* strains by multiplex-PCR method. 15th European Biotechnology Congress, 23-26 September, Istanbul, Turkey.