

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

**FARKLI YÖNTEMLER İLE ENKAPSÜLE EDİLEN
PROBİYOTİKLERİN İN
VİTRO VE İN VİVO ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

Uzm. Dyt. Berna MADALI

**Beslenme ve Diyetetik Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2022**

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

**FARKLI YÖNTEMLER İLE ENKAPSÜLE EDİLEN
PROBİYOTİKLERİN İN
VİTRO VE İN VİVO ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

Uzm. Dyt. Berna MADALI

**Beslenme ve Diyetetik Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Derya DİKMEN**

**ANKARA
2022**

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI YÖNTEMLER İLE ENKAPSÜLE EDİLEN PROBİYOTİKLERİN İN VİTRO VE İN VİVO ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Berna Madalı
Danışman: Doç. Dr. Derya Dikmen

Bu tez çalışması 29.12.2021 tarihinde jürimiz tarafından “Beslenme ve Diyetetik Doktora Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Saniye BİLİCİ (Gazi Üniversitesi)	(imza)
Üye:	Prof. Dr. Aylın AYZ (Hacettepe Üniversitesi)	(imza)
Üye:	Prof. Dr. Zehra BÜYÜKTUNCER DEMİREL (Hacettepe Üniversitesi)	(imza)
Üye:	Prof. Dr. Aslı AKYOL MUTLU (Hacettepe Üniversitesi)	(imza)
Üye:	Prof. Dr. Makbule GEZMEN KARADAĞ (Gazi Üniversitesi)	(imza)

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

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- ✗ Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

29 /12/2021

(İmza)
Berna MADALI

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ay aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

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

ETİK BEYAN

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

(İmza)

Arş. Gör. Berna MADALI

TEŞEKKÜR

Doktora sürecimin her aşamasında yanımda olup tüm hoşgörüsüyle bana yol gösteren, tezimin planlamasından yürütülmesine kadar her aşamada engin tecrübesi ve bilgisiyle bana destek olan, manevi olarak da desteğini her an derinden hissettiren çok kıymetli danışmanım Sayın Doç. Dr. Derya DİKMEN'e,

Enkapsülasyon işlemlerinde Sayın hocalarım Prof. Dr. Remziye YILMAZ ve Doç. Dr. Dr. F. Ceyda DUDAK ŞEKER ve onların nezdinde Yüksek Müh. Merve ÇANGA, Yüksek Müh. Sena ÇAKIR'a Yüksek Müh. Özlem IŞIK'a,

Çalışmaya verdikleri değerli katkılar için Sayın hocalarım Prof. Dr. Zehra BÜYÜKTUNCER DEMİREL ve Prof. Dr. Makbule GEZMEN KARADAĞ'a,

Histopatolojik analizler için desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Aytekin AKYOL ve Dr. Sarp UZUN'a, Laboratuvar analizlerinde desteklerini esirgemeyip, ellerinden gelen her konuda yardımcı olan başta Samet ECE ve tüm DİAGEN ekibine, Çalışmanın *in vivo* kısmında yardımlarını esirgemeyen ve zor günlerimde yanımda olan arkadaşım Arş. Gör. Lütfiye PARLAK YETİŞEN'e,

Tez sürecinde desteklerini esirgemeyen tüm Necmettin Erbakan Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü hoca ve asistanlarına, manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve tüm süreç boyunca yanımda olan tüm sevgili arkadaşlarıma,

Bu tezi bitirmemi en çok isteyen, fedakarlıktan asla kaçınmayan ve emeklerini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman sırtımı sonsuz güvenle yasladığım ve başaracağıma her zaman inanan ve beni de inandıran canım Babam Bahtiyar MADALI'ya, tüm yorgunluklarımı çekip beni her defasında tekrar ayağa kaldıran, benimle üzümlü benden çok seven sevgili annem Seçkin MADALI, ablam Kübra KOSKOS, abim Gökhan KOSKOS ve yeğenlerim Kuzey ve Kağan KOSKOS'a, gurbette bana aile olan, bana sonsuz güvenen ve her zorlukta yanımda olan Arş. Gör. Dilara DOĞAN'a,

Tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

ÖZET

Madalı, B. Farklı Yöntemler ile Enkapsüle Edilen Probiyotiklerin *in vitro* ve *in vivo* Etkinliğinin Belirlenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beslenme ve Diyetetik Programı Doktora Tezi, Ankara, 2022. Bu çalışmanın amacı; farklı probiyotik türlerinin farklı yöntemlerle enkapsüle edilerek, *in vitro* koşullarda canlılık düzeylerinin değerlendirilmesi, kısa süreli depolama koşullarında stabiliteilerinin belirlenmesi ve *in vivo* koşullarda farklı türdeki probiyotik bakterilerin, sağlıklı fare dokularında inflamasyon biyogöstergeleri üzerine etkilerinin incelenmesidir. Çalışmada ilk olarak, inflamasyonda etkili olduğu belirtilen *Lactobacillus rhamnosus* (LGG) ve *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) probiyotik bakterilerinin mikroenkapsülasyon (ME) ve nanoenkapsülasyon (NE) yöntemleri ile enkapsülasyonu (EK) yapılmıştır. *In vitro* koşullarda canlılık düzeyi daha yüksek bulunan EK yöntemi seçilerek, bir hafta boyunca depolamadaki (+4°C) stabiliteileri değerlendirilmiştir. Çalışmanın *in vivo* aşamasında, C57BL/6J türü 35 adet sağlıklı erkek fare çalışmaya dahil edilmiştir. Farelere üretilen ME probiyotikler ve fosfat buffer saline (PBS); 6 hafta boyunca her gün oral gavaj ile verilmiştir. Müdahalenin sonunda karaciğer dokularından PCR ile inflamatuvar sitokinlerin (IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α ve IFN- γ) gen ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir. Çalışmanın sonunda; *in vitro* koşullarda serbest bakterilerin canlılığını büyük oranda kaybettiği ($p<0.05$), her iki yöntemle enkapsüle edilen bakterilerde ise canlılık oranlarının daha yüksek olduğu bulunmuştur (EcN için, $p<0.05$ ve LGG için $p>0.05$). Yöntemlere göre bakterilerin canlılığını koruma düzeylerine bakıldığında ise LGG için benzer oranlarda koruduğu görülürken (ME için, $41,9\pm 1,24$ ve NE için, $41,2\pm 7,05$), EcN için nanofiberle enkapsülasyona kıyasla, ME yönteminde canlılığın daha yüksek olduğu bulunmuştur (sırasıyla $71,2\pm 1,65$ ve $83,9\pm 1,31$, $p<0.05$). ME ve serbest formda bulunan bakteriler bir hafta depolandığında, depolama süresince 1, 3 ve 7. günlerdeki canlılığında anlamlı bir azalma olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). IFN- γ gen ekspresyon düzeylerinde serbest EcN, ME EcN ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p=0.048$). IL-6, TNF- α , IL-4 ve IL-10'un gen ekspresyon düzeylerinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Bu çalışmanın sonuçları, *in vitro* koşullarda probiyotiklerin serbest formlarına kıyasla enkapsüle formlarının canlılıklarını daha iyi koruduğunu ve stabiliteilerini arttırdığı, ayrıca sağlıklı farelerde probiyotik kullanımının inflamasyon üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını göstermiştir. Bu çalışma sonuçlarının, farklı materyaller kullanılarak nanofiberle enkapsülasyon yöntemleri ve bu doğrultuda üretilen ürünlerin etkinliklerinin sağlıklı bireylerde de değerlendirilmesine yönelik yapılacak çalışmalara yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: nanoenkapsülasyon, mikroenkapsülasyon, probiyotikler, *in vitro-in vivo*, inflamasyon.

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 18878 ID numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

ABSTRACT

Madah, B. Evaluation of *in vitro* and *in vivo* Effectiveness of Encapsulated Probiotics Using Different Methods. Hacettepe University Graduate School Health Sciences Program of Dietetics, Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2022.

Probiotics have beneficial effects on several diseases although, very few studies evaluate their effects in healthy individuals. This study aimed to evaluate the viability levels of different probiotic species by encapsulation (EK) with different methods, compare the methods *in vitro*, determine their stability under short-term storage conditions, and examine the effects of probiotics on inflammation biomarkers in healthy mice *in vivo*. *Lactobacillus Rhamnosus* (LGG) and *Escherichia coli Nissle 1917* (EcN), which were known effective in inflammation, were encapsulated using microencapsulation (ME) and nanoencapsulation (NE) methods in the study. The method that preserves the higher viability of probiotics *in vitro* conditions was chosen, and their stability in storage conditions (+4°C) for one week was evaluated. *In vivo* assay was performed on the healthy C57BL/ 6J male mice (n=35). Microencapsulated probiotics and phosphate-buffered saline (PBS) were given to mice daily for six weeks by oral gavage. At the end of the probiotics intervention, inflammatory cytokine (IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α ve IFN- γ) gene expression levels were analyzed from the liver tissues. As a result, free bacteria lost their viability significantly *in vitro* conditions ($p < 0.05$), while the viability of probiotics were higher in bacteria encapsulated by both methods ($p < 0.05$ for EcN and $p > 0.05$ for LGG). When the encapsulation methods were compared in terms of viability, it was found that viability of LGG preserved similarly in both methods (for microencapsulation, $41.9 \pm 1.24\%$ and nanofiber encapsulation, $41.2 \pm 7.05\%$). In contrast, the viability of EcN was higher in the microencapsulation method than encapsulation with nanofiber ($83.9 \pm 1.31\%$ and $71.2 \pm 1.65\%$, respectively, $p < 0.05$). There was no significant decrease in their viability after the first, third and seventh days of storage (+4°C) ($p > 0.05$). IFN- γ levels were significantly different between free EcN, ME EcN and control groups ($p = 0.048$). There was no significant difference between the groups in IL-6, TNF- α , IL-4 and IL-10 levels ($p > 0.05$). This study results indicate that the encapsulated forms of probiotics preserve the viability of probiotics greater, increase their stability than the free forms, and have no effect on inflammation in healthy mice. The results of this study are thought to guide the studies related to nanofiber encapsulation using different materials and to evaluate the effectiveness of the encapsulated probiotics in healthy individuals.

Keywords: nanoencapsulation, microencapsulation, probiotics, *in vitro-in vivo*, inflammation.

This research was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project no: 18878 ID).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kuramsal Yaklaşımlar ve Kapsam	1
1.2. Amaç ve Hipotezler	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2. 1. Probiyotikler	5
2.2. Mikroorganizmaların Probiyotik Olarak Kabul Edilmesi İçin Gerekli Özellikler	6
2.3. Probiyotik Olarak Kabul Edilen Mikroorganizmalar	7
2.4. Probiyotiklerin Etki Mekanizması	9
2.5. Probiyotiklerin İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri	13
2.6. Probiyotiklerin Canlılığını Etkileyen Faktörler	20
2.6.1. Besin İşleme	20
2.6.2. Mide Asidi	21
2.6.3. Safra Tuzu	21
2.6.4 Oksijen İntoleransı	22
2.6.5. Diğer Faktörler	23
2.7. Enkapsülasyon İşlemleri	23
2.7.1. Mikroenkapsülasyon	24
2.7.2. Nanoenkapsülasyon	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. Çalışmanın Genel Planı	33
3.2. Probiyotiklerin Enkapsüle Edilmesi	34
3.2.1. Probiyotiklerin Hazırlanması	34
3.2.2. Probiyotiklerin Nanofiber ile Enkapsülasyonu	37
3.2.3. Probiyotiklerin Mikroenkapsülasyonu	38
3.3. Enkapsüle Edilen Bakterilerin <i>in vitro</i> Koşullarda Canlılığının Değerlendirilmesi	39
3.4. Enkapsüle Edilen Probiyotikleri Kısa Süreli Depolamanın Canlılık Düzeylerine Etkisi	41

3.5. Enkapsüle Edilen Probiyotiklerin <i>in vivo</i> Koşullarda Etkinliğinin Değerlendirilmesi	42
3.5.1. Farelere Enkapsüle Probiyotik Müdehalesi	43
3.5.2. Anestezi, Kan Alma ve Ötanazi	44
3.5.3. Doku Analizleri	45
3.5.4. Gastrointestinal Sistemin Histopatolojik Analizi	49
3.6. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	49
4. BULGULAR	51
4.1. Farklı Yöntemlerle Enkapsüle Edilen Probiyotik Bakterilerin <i>in vitro</i> Koşullarda Canlılığının Değerlendirilmesi	51
4.2. Depolamanın Canlılık Üzerine Etkisi	54
4.3. Farklı Yöntemlerle Enkapsüle Edilen Probiyotik Bakterilerin <i>in vivo</i> Koşullarda Etkinliğinin Değerlendirilmesi	55
4.3.1. Deney Hayvanlarının Vücut Ağırlığı Değişimlerinin Değerlendirilmesi	55
4.3.2. Deney Hayvanlarının Yem Tüketimi	59
4.3.4. Deney Hayvanlarının Enerji ve Makrobesin Ögesi Alım Düzeyleri	61
4.3.5. Deney Hayvanlarının İnflamasyonla İlişkili Sitokinlerin Gen Ekspresyon Düzeyleri	66
4.3.6. Deney Hayvanlarının Histopatolojik Bulguları	69
5. TARTIŞMA	71
5.1. Farklı Yöntemlerle Enkapsüle Edilen Probiyotik Bakterilerin <i>in vitro</i> Koşullarda Canlılığının Değerlendirilmesi	71
5.2. Depolamanın Canlılık Üzerine Etkisi	74
5.3. Enkapsüle Edilen Probiyotik Bakterilerin <i>in vivo</i> Koşullarda Etkinliğinin Değerlendirilmesi	75
5.3.1. Deney Hayvanlarının Vücut Ağırlığı Değişimlerinin Değerlendirilmesi	75
5.3.2. Deney Hayvanlarının Yem Tüketimleri ve Enerji ve Makrobesin Ögesi Alımlarının Değerlendirilmesi	77
5.3.3. Deney Hayvanlarının İnflamasyonla İlişkili Sitokin Düzeylerinin Değerlendirilmesi	78
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	83
7. KAYNAKLAR	90
8. EKLER	
EK 1. Etik Kurul Onayı	
EK 2. Probiyotiklerin MALDİ-TOF Analiz Sonuçları	
EK 3. Vücut ağırlığı, yem tüketimleri, enerji makrobesin ögeleri ile inflamasyon sitokinlerinin gen ekspresyon düzeyleri arasında korelasyon	
EK 4. Tez Çalışması Orjinallik Raporu	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

BHI	Brain-Heart Infusion
BKİ	Beden Kütle İndeksi
CAP	Selüloz Asetat
CRP	C-Reaktif Protein
EcN	<i>Escherichia coli Nissle 1917</i>
EK	Enkapsülasyon
EPS	Ekzopolisakkaritlerin
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
GRAS	Genel Olarak Güvenilir
HOMA-IR	İnsülin Direncinin Homeostatik Modeli Değerlendirmesi
İD	İnsülin direnci
IFN γ	İnterferon
IL	İnterlökin
ISAPP	Uluslararası Bilimsel Probiyotikler ve Prebiyotikler Derneği
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
LPS	Lipopolisakkarit
MALDI-TOF	Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/ionizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi
ME	Mikroenkapsüle
MRS	De Man, Rogosa and Sharpe agar
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NB	Nutrient Broth
NE	Nanoenkapsüle
PBMC	Periferik kan mononükleer hücre
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction – Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PVA	Polivinil alkol
SOD	Super oksit dismutaz
TBX	Tryptone Bile X-glucuronide
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör
VCAM	Vasküler hücre adezyon molekülü

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Probiyotiklerin canlılığını etkileyen etmenler.	20
2.2. Mikroenkapsülasyon	24
3.1. Çalışma akış şeması	34
Grafik	
3.1. Elde edilen spektradan örnekler.	36
3.2. Farklı formda bulunan LGG (a) ve EcN'nin (b) mide simülasyonu ve bağırsak simülasyonu sonunda canlılık düzeylerindeki azalma oranları	42
4.1. Serbest halde bulunan, mikroenkapsüle edilen ve nanofiberle enkapsüle edilen EcN (a) ve LGG (b) probiyotik bakterilerinin sindirim sistemi simülasyonundaki canlılık düzeyleri (log, kob/mL).	52
4.2. Farklı probiyotik (LGG ve EcN) müdahalesi süresince ortalama vücut ağırlıklarındaki değişim düzeyleri (g).	59
4.3. Müdahale süresince farklı formda EcN (a) ve LGG (b) verilen grupların haftalık yem tüketim miktarları (g/gün)	61
4.4. Müdahale öncesi ve sonrası dönemde LGG verilen grupların ortalama enerji ve makro besin ögesi alım düzeyleri.	64
4.5. Müdahale öncesi ve sonrası dönemde EcN verilen grupların ortalama enerji ve makro besin ögesi alım düzeyleri.	65
4.6. Farelerden elde edilen karaciğer dokusunun gruplara göre pro-inflamatuvar sitokinlerin gen ekspresyon düzeyleri.	68
4.7. Farelerden elde edilen karaciğer dokusunun gruplara göre anti-inflamatuvar sitokinlerin gen ekspresyon düzeyleri.	69
Resim	
3.1. Polimer ve probiyotik bakterinin karışımı	39
4.1. Bazı deney gruplarından alınan ince bağırsak dokularının görünümü	70

TABLOLAR

Tablo		Sayfa
2.1.	Probiyotik olarak kabul edilmesi için gereken kriterler	7
2.2.	Yaygın olarak kullanılan ve insanların tüketimine sunulan probiyotik mikroorganizmalar	8
2.3.	Probiyotik ve prebiyotiklerin etkileri ve etki mekanizmaları	12
2.4.	İnsan sağlığı üzerindeki probiyotiklerin etkilerini araştıran klinik çalışmalar.	15
3.1.	Simüle mide çözeltisi ve simüle bağırsak çözelti bileşenleri.	40
3.2.	Yemin makrobesin ögesi ve enerji içeriği.	43
3.3.	cDNA sentezinde kullanılan bileşenler ve miktarları.	46
3.4.	Primerlerinin oligonükleotit dizilimleri.	47
3.5.	Sitokinlerin çalıştığı optimum sıcaklık değerleri (°C).	48
3.6.	RT-PCR’da kullanılan komponentler ve miktarları.	48
3.7.	PCR aşamaları.	48
4.1.	Mikroenkapsülasyon ve nanofiber ile enkapsüle edilen LGG ve EcN probiyotik bakterilerin <i>in vitro</i> koşullarda canlılık düzeyleri.	53
4.2.	Mikroenkapsülasyon ve nanofiber ile enkapsüle edilen LGG ve EcN probiyotik bakterilerin <i>in vitro</i> koşullarda canlılık düzeylerindeki yüzde değişim.	54
4.3.	Mikroenkapsülasyon ile enkapsüle edilen LGG ve EcN probiyotik bakterilerin depolama (+4°C) boyunca canlılık düzeyleri	55
4.4.	Farklı deney gruplarında deney süresince vücut ağırlığı değişimleri.	57
4.5.	Farelerin müdahale öncesi ve sonrası dönemde farklı probiyotik gruplarına göre vücut ağırlıklarındaki değişim.	58
4.6.	Müdahale öncesinde ve müdahale dönemi boyunca farelerin ortalama yem tüketim miktarları (g/gün).	60
4.7.	Müdahale öncesi ve sonrası dönemlerde farklı gruplarda enerji ve makro besin ögesi alım düzeyleri.	63
4.8.	Farklı deney gruplarında gen ekspresyonu sonucu elde edilen ortalama pro-inflamatuvar sitokin düzeyleri.	67
4.9.	Farklı deney gruplarında gen ekspresyonu sonucu elde edilen ortalama anti-inflamatuvar sitokin düzeyleri.	68

1. GİRİŞ

1.1. Kuramsal Yaklaşımlar ve Kapsam

Probiyotikler, yeterli miktarlarda alındığında konak sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan yaşayan organizmalar olarak tanımlanmaktadır (1). Hayvan ve insan çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre; bağırsak mikrobiyotasındaki yararlı bakterilerin çeşitliliğini ve sayısını arttırdığı (2, 3), çeşitli gastrointestinal hastalıkların semptomlarında azalmaya neden olduğu (4, 5), kan kolesterol ve kan lipit profilini geliştirdiği (6, 7), kan basıncını ve hipertansiyonu azalttığı (8), kan glikoz toleransını ve diyabet kontrolünü geliştirdiği (9, 10) ve mental durum ile bilişsel fonksiyonları geliştirdiği bildirilmiştir (11).

Özellikle son yıllarda beslenmeyle ilintili hastalıkların artması ve tüketicilerin bilinçlenmesiyle birlikte, probiyotiklere olan ilgi giderek artmıştır. Toplumda probiyotik içeren ürünler, hem göreceli olarak ucuz hem de ulaşılabilir olduğu için sağlığın sürdürülmesinde genel olarak tercih edilen bir sektör haline gelmiştir (12). Fonksiyonel besin içeren ürün sektörünün %60-70'ini probiyotik içeren ürünlerin oluşturduğu bildirilmiştir (13). Tüketiciler probiyotik içeren ürünlere; besin (fermente ya da fermente edilmeyen) ya da supleman olarak (toz, tablet ya da kapsül formda) ulaşabilmektedirler. Bu ürünlerin üretim süreci ve depolama süresince canlılıklarını, organoleptik özelliklerini korumaları ve metabolik olarak aktif durumda olmaları gerekmektedir. Bu nedenle enkapsülasyon yöntemleri, üretilen ürünlerin tüketiciye ulaşana kadar geçen tüm işleme süreci boyunca olumsuz etkilerden korunmasını sağlayan etkin ve güncel bir yaklaşımdır (14). Probiyotiklerin enkapsülasyon teknolojisinde en sık kullanılan iki yöntem; mikroenkapsülasyon ve nanoenkapsülasyon yöntemleridir (15).

1.2. Amaç ve Hipotezler

Çalışmanın amacı, mikroenkapsülasyon ve nanoenkapsülasyon olmak üzere iki farklı enkapsülasyon yönteminin farklı türdeki probiyotiklerin (*Lactobacillus rhamnosus* (LGG) ve *Escherichia coli* Nissle 1917 (*EcN*)) canlılığı üzerine etkilerinin incelenmesi, *in vitro* koşullarda probiyotiklerin simüle mide ve simüle bağırsak

çözeltilerindeki canlılıklarının belirlenmesi ve yöntem karşılaştırmasının yapılması, kısa süreli depolama koşullarındaki stabiliteleri ve *in vivo* modelde üretilen probiyotiklerin inflamatuvar biyogöstergeler üzerindeki etkilerinin saptanmasıdır.

Hipotezler;

Hipotez 1: *in vitro* koşullarda, farklı yöntemler ve materyaller ile enkapsüle edilen LGG ve EcN suşlarının; simüle gastrik ve intestinal sıvıdaki canlılık düzeyleri açısından aralarında fark vardır.

Hipotez 2: *in vitro* koşullarda canlılığı daha yüksek bulunan yöntem ile enkapsüle edilen LGG ve EcN suşlarının; farklı depolama sürelerindeki stabiliteleri açısından aralarında fark vardır

Hipotez 3: *in vitro* koşullarda enkapsüle edilen LGG ve EcN probiyotik suşları enkapsüle edilmeyen probiyotiklere göre, simüle gastrik sıvı ve simüle intestinal sıvıdaki canlılık düzeyleri daha yüksektir.

Hipotez 4: *in vitro* koşullarda enkapsüle edilen LGG ve EcN probiyotik suşları enkapsüle edilmeyen probiyotiklere göre farklı depolama sürelerindeki stabiliteleri daha yüksektir.

Hipotez 5: Enkapsüle edilen LGG ve EcN; enkapsüle edilmeyen LGG ve EcN *in vivo* koşullarda inflamatuvar göstergelerin düzeyinde daha fazla azalmaya neden olur.

Hipotez 6: *in vivo* koşullarda, enkapsüle LGG ile enkapsüle EcN'nin, inflamatuvar sitokin düzeyleri üzerine etkileri arasında fark vardır.

2. GENEL BİLGİLER

Probiyotiklerin farklı birçok tanımının yapılmış olmasına rağmen, yeteri miktarda alındığında konak sağlığı üzerinde olumlu etki gösteren canlı mikroorganizmalar tanımı genel olarak kabul edilmektedir (16). Yapılan klinik çalışmalarda probiyotiklerin; gastrointestinal hastalıklar (irritabl bağırsak sendromu, *Helicobacter pylori*, inflamatuvar bağırsak hastalığı ve diyare gibi), alerjik hastalıklar (atopik dermatit gibi) ve obezite, insülin direnci sendromu, tip 2 diyabet ve non-alkolik karaciğer yağlanması gibi 21. yüzyılın en önemli sağlık sorunları üzerinde olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Bağışıklık sistemini güçlendirerek (immünomodülasyon) farklı birçok hastalığı etkilediği belirtilmektedir. Ayrıca bazı raporlarda, farklı kanser türleri ve yan etkileri üzerinde probiyotiklerin proflaktik kullanımının yararının olabileceği bildirilmiştir. Çoğu klinik çalışmada probiyotiklerin yararlı etkilerinin gösterilmiş olmasına rağmen, gerekli doz ve mikroorganizma türü hastalığa ve bireylere göre değişiklik göstermektedir (17).

Probiyotik bakterilerin çoğalması ve aktivite gösterebilmesi için prebiyotiklere gereksinimleri vardır. Prebiyotikler; gastrointestinal mikrofloranın aktivitesinde ve kompozisyonunda değişikliğe neden olan seçici fermente bileşenler olarak tanımlanmaktadır. Kolondaki yararlı bakteriler tarafından kullanılan prebiyotikler, mide ve ince bağırsakta sindirilemezken kolonda fermente edilirler. Fermentasyon sonucu açığa çıkan metabolitler bağırsak florası için enerji kaynağı olarak kullanılmakta ve sağlığı olumlu yönde etkilemektedir (18). Probiyotik bakterilerin prebiyotiklerle birlikte oluşturduğu sinerjik etki; 1995 yılında Gibson ve Roberfroid tarafından bildirilmiş ve “sinbiyotik” olarak adlandırılmıştır (19). Probiyotik ve prebiyotiklerin birlikte kullanımının, gastrointestinal yolakta probiyotik bakterilerin canlılığını koruyarak, probiyotiklerin etkinliğinde artışa neden olduğu belirtilmiştir. Yapılan çalışmalarda; probiyotik ve prebiyotiklerin uygun kombinasyonlarının, probiyotik ya da prebiyotiklerin tek başına verilmesine kıyasla daha etkili olduğu gösterilmiştir (20, 21).

Probiyotiklerin teröpatik etki gösterebilmesi için gerekli olan düzeyin 10^6 - 10^7 kob/g olduğu ve kolona kadar istenilen düzeyde kalabilmesi için probiyotik içeren ürünlerin en az 10^8 - 10^9 kob/g olması gerektiği bildirilmiştir (22). Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinin Genel Etiketleme ve Beslenme Yönünden Etiketleme Kuralları

Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkındaki Tebliğ'e göre ise; probiyotik bakteri içeren gıdanın en az 1.0×10^6 kob/g canlı bakteri içermesi gerekmektedir (23). Bu yüzden probiyotik suşların, bileşiminde buldukları ürün içinde ve sindirim sistemi boyunca canlılığını sürdürmesi gerekir. Ancak yapılan çalışmalarda serbest haldeki probiyotiklerin çevre şartlarına ciddi ölçüde duyarlı olduğu ve canlılıklarını büyük ölçüde kaybettikleri gözlenmiştir (24). Probiyotiklerin besinlerdeki canlılığı; probiyotik türü, pH, laktik asit ve asetik asit gibi metabolitlerin konsantrasyonu, hidrojen peroksit ve oksijen varlığı, işleme ve depolama sıcaklıkları, inokülasyonun oranı ve hızı, eklendiği besinlerin türü ve yapısı gibi faktörlerden etkilenmektedir (25-27). Probiyotiklerin olumsuz faktörlerden korunması ve nütrosötikler, fonksiyonel ürünler veya besinlerin üretiminde kolaylıkla kullanılabilmesi için mikro- ve nano-boyutlarda enkapsülasyon uygun alternatif bir yöntemdir. Her iki enkapsülasyon yöntemiyle de probiyotiklerin fonksiyonelliği korunup, geliştirilmektedir (15).

Enkapsülasyon, biyoaktif bileşenler ve yararlı bakteriler gibi küçük maddelerin; karbonhidrat polimerleri, proteinler ve yağlar gibi bir duvar materyali içinde mikro ya da nano boyutta yapılar oluşturularak kaplanmasıdır (28-30). Enkapsülasyonla besinin üretim ve raf ömrü sürecindeki çevresel koşullara, depolama koşullarına, sindirim sistemindeki pH değişiklikleri ve enzimlere karşı bariyer oluşturularak probiyotiklerin canlılıklarını koruması amaçlanmaktadır. Probiyotik enkapsülasyonu ile enkapsülasyon yöntemi ve materyaline bağlı olarak serbest haldeki suşlara göre canlılığını ciddi oranda koruduğu gözlenmiştir (31). Ayrıca enkapsülasyon işlemi biyoyararlılığın artırılmasını ve biyoaktif bileşenlerin kontrollü salınımını sağlarken; enkapsülasyon işlemi sonucu istenmeyen koku ve tat bileşenleri de maskelenebilir (29, 30). Probiyotiklerin enkapsülasyonu genel olarak sprey kurutma, dondurarak kurutma, akışkan yatak kaplama, ekstrüzyon teknolojisinin kullanılması ve elektrospin yöntemi ile yapılmaktadır (32). Farklı enkapsülasyon yöntemleri kullanılması son ürün olarak farklı yapıların ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Mikroenkapsülasyon; probiyotik bakterilerin, ortamdaki zararlı etkenlerden koruyan ve belirli koşullar altında kontrollü salınımını gerçekleştiren bir matrisle kapsüllenmesi işlemidir. Probiyotiklerin kapsüllenmesinin amacı; sindirim sistemi boyunca düşük pH, safra tuzu ve diğer bileşenlerden korunmasıdır. Bir mikrokapsül,

birkaç mikron ile 1 mm arasında değişen çok küçük çaplı katı ve sıvı bir materyali çevreleyen yarı geçirgen veya geçirgen olmayan, küresel, ince ve güçlü bir zar içerir. Kapsülleme materyali, gıda uygulamalarında kullanılacağı için genel olarak güvenilir kabul edilen materyallerden olmalıdır. Genellikle aljinat, kitosan, karboksimetil selüloz, ksantan zımkı, nişasta, karagenan, jelatin ve pektin gibi gıda sınıfı polimerler, farklı mikrokapsülleme yöntemlerinde kullanılmaktadır (33). Ayrıca kazein ve whey proteini gibi süt proteinleri de kapsülleme materyali olarak kullanılmaktadır (34). Aljinat, probiyotiklerin mikroenkapsülasyonunda pH'ya dayanıklı olduğu için sıklıkla tercih edilen doğal bir polimerdir. Fakat yöntemin etkinliğinin artırılması için, duvar materyali olarak ek bir materyalin daha kullanılması önerilmektedir (33).

Nanoenkapsülasyon ise, nanoteknolojinin bioaktif maddelerin nano boyutlardaki taşıyıcı materyaller içerisine hapsedilmesini kapsayan bir yöntemdir (35). Polimerik nanoparçacıkların oluşması sırasında yakalanmış bir biyoaktif madde ve polimerin oluşturduğu matriks bir emülsifiyer ya da yüzey aktif madde ile çevrilerek nanoenkapsüle form oluşturulur (36).

2. 1. Probiyotikler

“Probiyotik” kelimesi, “yaşam için” anlamına gelen “pro” ve “biota” kelimelerinin birleştirilmesiyle türetilen Yunanca kökenli bir kelimedir. Yapılan birçok farklı tanımlara karşın, FAO/WHO'nun 2002'deki panelinde; “yeteri miktarda alındığında insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan canlı mikroorganizmalar” tanımı genel olarak kabul görmektedir (37). Bu tanım, 2020 yılında Uluslararası Bilimsel Probiyotikler ve Prebiyotikler Derneği (ISAPP) tarafından da kabul görmüştür (1). Bu tanımda, bakterilerin canlı olması ve istenen etkiyi gösterebilmesi için belli bir düzeyde olması gerektiği vurgulanmıştır. Teorik olarak ise probiyotikler; bakteri kültürleri, maya hücreleri ya da bağırsaktaki faydalı bakterilerin etkinliğini arttıran ve gastrointestinal çevreyi düzenleyerek sağlığı geliştirebilen mikroorganizmalar olarak belirtilmektedir (17).

Probiyotik içeren ürünlerin üretiminde probiyotik bakterileri farklı formlarda (dondurulmuş ya da kuru formda) kullanılmaktadır. Sadece besinler aracılığıyla değil, supleman (liyofilize, kapsül ya da tablet şeklinde) olarak da bireylerin tüketimine sunulmaktadır (16, 38-40).

Çok sayıda cins ve türdeki mikroorganizma, potansiyel probiyotik olarak düşünülse de, ticari olarak üretilen probiyotik içeren ürünlerde genellikle *Lactobasillus* ve *Bifidobakteri* türleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun temel sebebi; bu türlerin uzun yıllardır kullanımının güvenli olduğunun bildirilmesi ve GRAS (Genel olarak Güvenli) listesinde yer almasıdır. *Laktokbasillus* ve *Bifidobakteri* türleri insan bağırsağında baskın olarak bulunur. *Laktobasillus* ince bağırsakta, *Bifidobakteri* türleri ise kalın bağırsakta daha baskındır. Fakat *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces* ve *Propionibacterium* (maya) (*Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces boulardii*) ve *filamentous* (mantar) (*Aspergillus oryzae*) türleri de sağlık üzerinde olumlu etkileri nedeniyle probiyotik bakteri olarak kullanılmaktadır (16, 41, 42).

2.2. Mikroorganizmaların Probiyotik Olarak Kabul Edilmesi İçin Gerekli Özellikler

Her bakteri probiyotik bakteri olarak kabul edilmez. Bir bakterinin probiyotik olarak kabul edilmesi için ilk olarak bakterilerin güvenilir ve fonksiyonel ve bunlarla birlikte teknolojik olarak kullanılabilir olması gerekmektedir (Tablo 2.1). Vücuda alındığında sağlığı olumsuz yönde etkilemeyen ve toksin üretmeyen özellikte olması yani Genel Olarak Güvenilir (Generally Recognized As Safe, GRAS) olarak kabul edilmesi gerekmektedir (43).

Probiyotiklerin karakteristik özellikleri, mikroorganizmaların türleri ya da familyalarına göre değil, belirli bir türün daha spesifik alt türlerine göre değişiklik göstermektedir (44). Bakterilerin alt türlerinin güvenilirliği; bakterilerin kaynağına, patojenik bakterilerle ilişkisine ve antibiyotiklere karşı direnç gösterebilme özelliğine bağlıdır. Fonksiyonel özellikleri ise; gastrointestinal yolakta canlı kalabilme yeteneği ve immünomodülatör etkileri dikkate alınarak değerlendirilmektedir.

Teknolojik olarak üretilen ve probiyotik içeren ürünlerin depolama ve taşıma süreçleri boyunca canlılığını koruması ve özelliklerini yitirmemesi gerekmektedir (45). Probiyotiklerin farklı taşıyıcı ya da matriks içinde olması, türlerin canlılığını azaltabileceğinden, ürünlerin özelliklerinin değişmesine neden olur. Probiyotiklerin piyasaya sunulan ürünlerdeki karakteristik özellikleriyle uyumlu olarak sağlığı koruyucu etkilerinin olduğu da gösterilmelidir (46).

Tablo 2.1. Probiyotik olarak kabul edilmesi için gereken kriterler (37, 47).

Kriterler	Gerekli özellikler
Güvenirlilik	<ul style="list-style-type: none"> • İnsan ya da hayvan kaynaklı olması • Sağlıklı bireylerin gastrointestinal sistemlerinden izole edilmesi • Uzun süredir, kullanımının herhangi bir risk yaratmaması • Kesin tanımlama (fenotip ve genotip özelliklerinin) • Enfeksiyon hastalıklarıyla herhangi bir ilişkisinin olduğuna dair verilerin olmaması • Yan etkilerinin olmaması
Fonksiyonellik	<ul style="list-style-type: none"> • Bağırsak mikrobiyotasına karşı göstermiş olduğu rekabet gücü • Hedef bölgelerde büyüme ve gelişme, metabolik aktiviteyi sürdürebilme ve hayatta kalabilme yeteneği • Safra tuzu ve enzimlere karşı direnç • Düşük mide pH'sına karşı gösterdiği direnç • Bağırsakta yaşayan mikrobiyal türlere karşı göstermiş olduğu rekabet gücü • Patojen bakterilere karşı antagonist aktivite (örneğin, <i>H. Pylori</i>, <i>Salmonella sp.</i>, <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Clostridium difficile</i>) • Endojenik intestinal mikrobiyota tarafından üretilen asit ve bakteriyosinlere direnç • Tutunabilme, kontakta belirli bölgelerde kolonize olabilme yeteneği ve gastrointestinal sistemde yeteri düzeylerde canlı kalabilme yeteneği
Teknolojik kullanılabilirlik	<ul style="list-style-type: none"> • Fazla miktarlarda ve yüksek verimle kültürlerin kolay üretilmesi • Probiyotik içeren ürünlerin fiksasyon (dondurma, dondurarak-kurutma gibi), hazırlama ve dağıtım süreçleri boyunca istenen özelliklerin korunması ve canlılığın sürdürülmesi • Son üründe (aerobik ve mikro-aerofilik durumlarda) yüksek depolama sağkalım oranı • Son ürünün tadında istenmeyen değişikliklerin olmaması (besin endüstrisi açısından) • Genetik stabilite • Bakteriyofajlara direnç

2.3. Probiyotik Olarak Kabul Edilen Mikroorganizmalar

Probiyotik olarak kabul edilmesi için gerekli özelliklere sahip olan birçok mikroorganizma tanımlanmıştır (Tablo 2.2). Özellikle ticari olarak üretilen ürünlerde de yaygın kullanılan *Laktobasillus* ve *Bifidobakteri* türleri, araştırmacıların da üzerinde yoğun olarak çalıştığı ve en çok bilinen probiyotik türleridir (16). Bu

bakterilerden probiyotik olduğu onaylanan ve yetişkin bireyler, kadın sağlığı ve çocuklar için üretilen probiyotik ürünlerin sağlık üzerine etkileri ve dozla olan ilişkileri; Kanada’da 2021 yılında güncellenen rehberde belirtilmiştir ve bu rehberler güncel veriler doğrultusunda her yıl yenilenmektedir (48).

Tablo 2.2. Yaygın olarak kullanılan ve insanların tüketimine sunulan probiyotik mikroorganizmalar (49).

Laktobasillus türleri	Bifidobakteri türleri	Diğer laktik asit bakterileri	Diğer mikroorganizmalar
<i>L. acidophilus</i> (a),*	<i>B. adolescentis</i> (a)	<i>Enterococcus faecium</i> (a)	<i>Bacillus clausii</i> (a),* <i>Escherichia coli</i>
<i>L. amylovorus</i> (b),*	<i>B. animalis</i> (a),* <i>B. bifidum</i> (a)	<i>Laktokokus laktis</i> (b), *	<i>Nissle 1917</i> (a) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (boulardi)
<i>L. casei</i> (a),(b),*	<i>B. breve</i> (b)	<i>Streptokokus termofilus</i> (a), *	(a),*
<i>L. gasseri</i> (a),*	<i>B. infantis</i> (a)		
<i>L. helveticus</i> (a),*	<i>B. longum</i> (a),*		
<i>L. johnsonii</i> (b),*			
<i>L. pentosus</i> (b),*			
<i>L. plantarum</i> (b),*			
<i>L. reuteri</i> (a),*			
<i>L. rhamnosus</i> (a),(b),*			

(a) Daha çok farmasötik ürün olarak (b) daha çok gıda katkı maddesi olarak, *QPS (Nitelikli Güvenirlik Varsayımı) mikroorganizmalar

Laktobasiller en çok bulunan probiyotik mikroorganizmalardan biridir. Gram pozitif, spor oluşturmeyen, katalaz ve oksidaz negatif, sitokrom bulundurmeyen, normalde aerobik olmayan fakat bazı durumlarda oksijeni tolere edebilen ve güçlü fermentatif özelliklere sahiptir. Şeker fermentasyonunun son ürünü laktik asittir. Sindirimi kolaylaştırdığı, immün stimülasyonunu sağladığı ve patojen inhibisyonuna neden olduğu için bağırsak sağlığını olumlu yönde etkiler. Laktobasil türleri gastrointestinal yolakta baskın bir tür değildir fakat kolaylıkla burada üreyebilir ve çeşitli besin uygulamalarında uzun süre güvenli olarak kullanılabilir. İnsan bağırsağında en yaygın bulunan türler; *Lactobacillus acidophilus* kompleksi, *Lactobacillus salivarius* ve *Lactobacillus casei* kompleksidir. *Lactobacillus acidophilus* kompleksi, 6 benzer fenotipe sahip bakteriden oluşmaktadır. Fakat *L. asidofilus*; asit ve safraya dirençli, antimikrobiyal aktivitesi ve gastrointestinal yolak boyunca canlılığını koruyabilmesinden dolayı en yaygın kullanılan türüdür. *L. salivarius* ise; safra ve aside dirençli, gastrik epitel hücrelere güçlü bağlanma

yeteneğine sahip ve intestinal yoldan kolaylıkla geçebildiğinden en yararlı tür olarak kabul edilmektedir. *L. casei* kompleksi ise *Lactobacillus casei/paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus GG* ve *Lactobacillus casei shirota* alt türlerini içerir.

Lactobacillus rhamnosus GG (LGG), insan vücudunda kommensal mikrobiyotada bulunan ve bağırsakta bakteriyel dengeyi sağlayarak ve lokal ve sistemik bağışıklığı düzenleyerek sağlığı olumlu yönde etkileyen bir bakteridir. Olumsuz sindirim sistemi koşullarında canlılığını sürdürebilme ve insan ve hayvan bağırsağında kolonize olma yeteneğine sahiptirler (50). Yapılan çalışmalar, LGG'nin hücre duvarı bileşenleri aracılığıyla IL-6, IL-10 ve TNF- α salınımını uyardığını ve böylece bağışıklık sistemini aktive ettiğini belirtmiştir (51, 52). Ayrıca LGG tarafından eksprese edilen p40 proteini aracılığıyla da bağırsak bağışıklığı üzerinde olumlu etkilerinin olabileceği bildirilmiştir (53).

E. coli Nissle 1917 (EcN), patojenik olmayan fekal bir bakteridir ve probiyotik olarak kabul edilir. EcN gram negatif bir bakteridir (54). Özellikle bu bakterinin immün modülatör etkilerinin olduğu, bununla birlikte intestinal bariyer fonksiyonunu geliştirdiği gösterilmiştir. Patojenik bakterilerin ürettiği toksinleri azaltan ve patojenik bakterilerin gelişimini baskılayan bakteriyosidal bileşikler üretebilme özelliğine sahiptir. EcN'nin etkinliği ve güvenilirliği üzerine yapılan çalışmalara bakıldığında, özellikle ülseratif kolit, kronik konstipasyon, Crohn's hastalığı ve irrtiabl bağırsak sendromu gibi gastrointestinal hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde etkilerinin olduğu gösterilmiştir (55-57).

2.4. Probiyotiklerin Etki Mekanizması

Her bir probiyotik bakterinin, türüne ve birlikte/tek başına alım durumuna göre etki düzeyleri farklılık göstermektedir ve bununla ilgili çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır (17).

Moleküler ve genetik çalışmalar probiyotiklerin yararlı etkilerini dört temel mekanizma ile açıklamaktadır;

- Anti mikrobiyal maddelerin üretimi (58)
- Bağırsak epitelindeki resptörlere bağlanmak için ve besin için patojen bakterilerle yarışma (59)

- Konak için immünomodülasyonu sağlama (60)
- Bakteriyel toksin üretiminin inhibisyonunu sağlama (61)

İlk iki maddede yer alan mekanizmalar probiyotiklerin, doğrudan diğer mikroorganizmalar üzerindeki etkileriyle ilişkilidir. Probiyotikler diğer bakterilerle ilişkileri aracılığıyla, vücudun normal fonksiyon gösterebilmesi için gerekli olan ve bağırsakta yaşayan yararlı bakteriler ile bağırsakta bulunan patojen bakteriler arasındaki dengeyi sağlarlar. Bunun sonucunda da sağlıklı bir mikrobiyota oluşumunu desteklerler (62, 63). Sağlıklı bir mikrobiyota özellikle enfeksiyonla ilişkili hastalıkların tedavi ve önlenmesinde önemli bir etkidir. Probiyotiklerin kümeleşme özelliği, epitelde patojenik bakterilerin kolonizasyonunu engelleyerek koruyucu bariyer oluşturmasına sağlar (62). Probiyotik bakteriler ayrıca epitel hücre reseptörlerine bağlanıp patojen bakterilerin bağlanmasını engellerler. Bağırsak üzerindeki bu etkileri sayesinde konak sağlığı korunur.

Yapılan *in vitro* çalışmalarda, probiyotikler tarafından üretilen düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin (hidroperoksit ve kısa zincirli yağ asitleri gibi), patojenlerin çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (63, 64). Örneğin *Lactobasil* türleri; bakteriyosin, düşük molekül ağırlıklı bileşikler (antibakteriyel peptidler), yüksek molekül ağırlıklı bileşikler ve bazı antibiyotikleri üretebilir. Probiyotik bakteriler, konak tarafından üretilen safra tuzundan daha güçlü antibakteriyel etkisi olan ve safra asidinin bir türü olan dekonjüge safra asidini üretebilir (63, 64). Fakat *Lactobasil* türlerinin ürettiği bu antibakteriyel bileşiğe karşı kendilerinin nasıl direnç gösterdiğinin anlaşılması için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Kontamine besin ya da çevre bulaşı sonrası patojenik bağırsak mikrobiyotasının aktivitesine karşı koruyucu etkileri vardır. Probiyotikler; *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Staphylococcus* ve *Yersinia* türleri gibi patojenik bakterilerin gelişimini etkili bir şekilde inhibe ederek besin zehirlenmeleri prevelansında azalmaya neden olabilir (17).

Probiyotikler, mikrobiyota üzerindeki etkileri aracılığıyla immün sistemi etkilemektedir. Bağırsak mikrobiyotası, immünomodülatör etkisini;

1. Çevresel antijenlere (besinle ve solunum yoluyla alınan) karşı immünolojik toleransın başlatılması ve sürdürülmesi

2. Bakteriyel ve viral kaynaklı patojenlere karşı immünolojik reaksiyonların başlatılması ve kontrolü

3. Oto-agresif ve alerjik reaksiyonların inhibisyonu

ile sağlamaktadır (60).

Probiyotiklerin epitel hücelere bağlanma özelliği ile sinyal yolağı uyarılır ve immünolojik modülasyon indüklenir. Bu etkilerini, bazı çözünür bileşenlerin salınması ve epitel hüceler üzerinden immüniteden sorumlu bazı hücelerin direkt ya da indirekt olarak aktivasyonunu aracılığıyla da gerçekleştirir. Bunun sonucunda immün sistemle ilişkilendirilen bazı hastalıklarda ve kanser hücelerinin eliminasyonunda etkili olabileceği bildirilmiştir (63, 65).

Probiyotikler tarafından indüklenen bağışıklık sistemi; ayrıca immüoglobülinlerin üretimini artırması, makrofajların ve lenfositlerin aktivitesini artırılması ve interferon- γ üretimini indüklenmesi ile uyarılmaktadır. Probiyotikler; konakta bulunan özelleşmiş hüceler tarafından tanınan (örneğin reseptörlerini içeren) metabolitler, hücre duvarı bileşenleri ve DNA aracılığıyla konjenital ve edinilmiş bağışıklık sistemini etkileyebilir (63). Konakta bulunan bu özelleşmiş hüceler immün cevap için önemli olan intestinal epitel hüceler ve intestinal immün hücelerdir. Laktik asit bakterilerinin hücre duvarı bileşenleri, makrofaj aktivitesini uyarır. Makrofajlar, serbest oksijen radikallerinin ve lizozomal enzimlerin üretimini artırarak zararlı mikroorganizmaların ortadan kaldırılmasını sağlar. Probiyotik bakteriler, gastrointestinal yolaktaki immünokompetan hüceler tarafından sitokin üretimini stimüle ederler (66). Diğer taraftan, mayaların immünolojik aktiviteleri hücre duvarlarında bulunan glukanlarla ilişkilendirilmektedir. Bu bileşikler, retikuloendotelial sistem cevabını stimüle etmektedir (67).

Probiyotiklerin bakteriyel toksin üretimini inhibe etmesinin yanı sıra, detoksifikasyonda da adsorpsiyon ile etkili olabileceği belirtilmiştir. Bazı türler, hücre duvarlarına toksinleri bağlayarak ya da bağırsakta toksinlerin emilimlerini azaltarak toksinleri detoksifiye edebilirler. Aflatoksin gibi mikotoksinlerin metabolizmaları aracılığıyla da detoksifikasyona neden olabilirler (68, 69). Fakat her probiyotik bakteri detoksifiye edici etki göstermez. Probiyotiklerin diyareye karşı olumlu etkisi, toksinlere karşı konak sağlığını koruma yeteneğine bağlanmaktadır. Toksin üretimine neden olan metabolik reaksiyonların azalması; enzimlerin, vitamin ve antimikrobiyal

bileşiklerin üretimine neden olan yolların stimüle edilmesiyle de ilişkilendirilmektedir (63).

Bu temel mekanizmaların haricinde, probiyotiklerin ayrıca sindirim sistemi üzerinde de etkileri vardır. Bazı vitamin ve minerallerin emiliminin artırılması ve organik asit ve aminoasit üretiminin uyarılmasında da görev almaktadırlar (46). Esteraz, lipaz ve koenzim A, Q, NAD ve NADP gibi bazı kritik moleküllerin üretiminde de rol oynayabilirler. Probiyotiklerin metabolizması sonucu oluşan bazı ürünler; antibiyotik (asidofilin, basitrasin, laktasin), antikanserojenik ve immünosupresif özellik gösterebilirler (70-72).

Probiyotiklerin etkileri; türüne ve alt türlerine bağlı olarak değişir. Çünkü probiyotik bakterilerin türlerine göre; hücresel yapı, hücre yüzeyi, boyutu, metabolik özellikleri ve mikroorganizmaların sekresyonları farklılık göstermektedir. Tablo 2.3'te probiyotiklerin etkileri ve mekanizmaları özetlenmektedir (17).

Tablo 2.3. Probiyotik ve prebiyotiklerin etkileri ve etki mekanizmaları.

Probiyotikler	
Bağırsak mikrobiyota üzerindeki etkileri	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Kolonizasyon direnci <ul style="list-style-type: none"> - Patojen baskılama ▪ Sindirim sürecini destekleme ▪ Performansı artırma
Metabolik etkileri	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Bağırsaktaki toksin düzeyini azaltma <ul style="list-style-type: none"> - Bağırsak Mikroflorası üzerine olumlu etki - Diyare üzerine olumlu etki ▪ Laktöz emilimini artırma ▪ Safra tuzunun sekresyonu ve dekonjügasyonu <ul style="list-style-type: none"> - Serum kolesterol düzeyinde azalma
İmmünomodülatör etkileri	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Besin ögesi sentezi ▪ İmmün cevabı geliştirme ▪ Solunum yolu hastalıklarına karşı koruma
Prebiyotikler	
İntestinal mikrobiyotayı etkileme	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Yararlı bağırsak bakterilerinin gelişimini olumlu etkileyerek konak sağlığını koruma
Karsinojen inhibisyonu	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Kolorektal ve diğer tümör gelişim riskini azaltma
İmmünomodülasyon	<ul style="list-style-type: none"> ▪ İmmün sistemi destekleme
Patojen inhibisyonu	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Enfeksiyonlara karşı koruma
Bağırsak mikrobiyota üzerindeki etkileri	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Obezite ve metabolik sendrom riskinde azalma

2.5. Probiyotiklerin İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri

Salgın hastalıkların artması ve yaşam süresinin uzaması, gastrointestinal mikrobiyota dengesi ve probiyotik bakterilerin yararlı etkileriyle ilgili araştırmalara olan ihtiyacın artmasına neden olmuştur. Değişen yaşam koşulları sonucunda bozulan intestinal mikroorganizma dengesinin yeniden sağlanması ve bu dengenin sağlanmasında probiyotik bakterilerin istenen etkiyi büyük oranda gösterebildiği belirtilmektedir (17). Bağırsak mikrobiyotası üzerinden probiyotikler; konakta gerçekleşen metabolik süreçlerde (kolesterol emilimi, kan basıncı ve glikoz metabolizmasının regülasyonu gibi), hastalıkların gelişiminde ve önlenmesinde rol oynamaktadır (73-75).

Probiyotik bakterilerin, makrofaj fonksiyonunu ve immünoglobulin sekresyon hücrelerinin sayısını etkileyerek sistemik immün cevabı uyardığı bilinmektedir (76). Fakat immün fonksiyonun değerlendirilmesi oldukça karmaşıktır. Diyet müdahalelerinin potansiyel etkisini tam olarak değerlendirmek için çoklu göstergelere gereksinim vardır. Probiyotik bakteriler, türlerine ve alt türlerine göre inflamasyon üzerinde farklı etki gösterebilirler. Bazı türler proinflamatuvar sitokinler üzerinde etki gösterirken bazıları da anti-inflamatuvar etki göstermektedirler (77).

Çoğu çalışmada farklı probiyotik türlerinin inflamatuvar biyogöstergelerini olumlu etkilediği belirtilmesine rağmen, türe ve hastalığa bağlı olarak olumsuz etkilerinin de olabileceği ya da etkilerinin olmayabileceği gösterilmiştir (78-82). Literatürde konuyla ilgili olarak; inflamasyonla ilişkili hastalıklarda bile probiyotiklerin etkilerine yönelik tam bir fikir birliğinin sağlanmadığı görülmüştür (79, 80, 82). Buna karşın son yıllarda COVID-19 salgınının da ortaya çıkmasıyla birlikte, bağışıklığı desteklemek amacıyla bireylerin besin destekleri ve probiyotik kullanımına yönelik eğilimleri de artmaktadır ve bu bireylerin çoğu sağlıklı bireylerden oluşmaktadır (83).

Sağlıklı bireyler üzerinde yapılan çalışmalara bakıldığında probiyotiklerin inflamasyon biyogöstergelerini olumlu yönde etkilediği özellikle anti-inflamatuvar sitokin düzeylerinde artışa neden olduğunun belirtilmesine rağmen (84-86), inflamasyon göstergelerinde istenen etkiyi yaratmadığı hatta olumsuz yönde etkileyebileceği de bildirilmiştir (76, 87-92).

Son yıllarda konuyla ilgili yapılan bir sistematik derlemede (93); toplamda 18 çalışmanın olduğu ve probiyotiklerin inflamasyon üzerindeki etkisinin sınırlı olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmaların yalnızca sekizinde probiyotiklerin önemli etkilerinin olabileceği belirtilmiş fakat çalışmaların heterojen olması ve farklı metodolojilerinden dolayı genel öneri verilirken dikkatli olunması gerektiği vurgulanmıştır. Konuyla ilgili uzmanlardan alınan fikirler doğrultusunda yayınlanan bir makalede (94); hastalığa bağlı semptomatik bir durum olmadığında; probiyotik kullanımının biyolojik etkilerinin ne olacağına dair tahminde bulunmanın oldukça zor olduğu belirtilmiştir. Bu sebeple yapılan çalışmada sağlıklı hayvan modelinde probiyotiklerin inflamasyon parametrelerine etkisi gösterilerek literatüre katkı sağlanması amaçlanmıştır.

Probiyotik bakterilerin önceki bölümde belirtilen etki mekanizmaları aracılığıyla birçok hastalığın tedavisinde ve önlenmesinde etkili olduğu çalışmalarda gösterilmiştir. Konuyla ilgili yapılan çalışmalar Tablo 2.4'te özetlenmiştir.

Tablo 2.4. Probiyotiklerin insan sağlığı üzerindeki etkilerini araştıran bazı klinik çalışmalar.

Referans	Katılımcılar	Mikroorganizma	Uygulama süresi	Temel sonuçlar
Obezite				
(95)	50 obez adölesan	<i>L. salivarius</i> Ls-33	12 hafta	<i>Bacteroides</i> , <i>Prevotellae</i> ve <i>Porphyromonas</i> düzeylerinde artış
(96)	50 obez adölesan	<i>L. salivarius</i> Ls-33	12 hafta	Etki görülmedi
(97)	Yüksek BKİ'ye sahip 87 birey	<i>L. gasseri</i> SBT2055	12 hafta	BKİ, bel çevresi, abdominal yağ dokusunda ve kalça çevresinde azalma
(98)	Visseral yağ dokusu fazla olan 210 birey	<i>L. gasseri</i> SBT2055	12 hafta	BKİ ve arteriyal kan basıncında azalma
(99)	Obez 40 birey	<i>L. plantarum</i>	3 hafta	BKİ ve arteriyal kan basıncında azalma
(100)	Yüksek BKİ'ye sahip 75 birey	<i>L. acidophilus</i> La5, <i>B. lactis</i> Bb12, <i>L. casei</i> DN001	8 hafta	PBMC'nin gen ekspresyonunda, BKİ, yağ yüzdesi ve leptin düzeylerinde azalma
(101)	Hafif kilolu ve obez 70 birey	<i>E. faecium</i> and 2, <i>S. thermophilus</i> strains	8 hafta	Vücut ağırlığında, sistolik kan basıncında azalma ve fibrinojen düzeylerinde artma
(102)	60 hafif kilolu birey	<i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>S. thermophilus</i>	6 hafta	Lipit profili, insülin duyarlılığında iyileşme ve CRP düzeylerinde azalma
(103)	58 post menopozal obez kadın	<i>L. paracasei</i> N19	6 hafta	Etki görülmedi
(104)	156 hafif kilolu yetişkin birey	<i>L. acidophilus</i> La5, <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb12	6 hafta	Açlık glikoz konsantrasyonunda azalma ve HOMA-IR düzeylerinde artış

Tablo 2.4. (Devam) Probiyotiklerin insan sağlığı üzerindeki etkilerini araştıran bazı klinik çalışmalar.

İnsülin direnci (İD) sendromu				
(105)	İD olan 28 hasta	<i>L. casei</i> Shirota	12 hafta	Etki görülmedi.
(106)	İD olan 30 hasta	<i>L. casei</i> Shirota	12 hafta	VCAM-1 düzeylerinde belirgin azalma
(107)	İD olan 24 post menopozal kadın birey	<i>L. plantarum</i>	12 hafta	Glikoz ve homosistein düzeylerinde belirgin azalma
Tip 2 diyabet (T2D)				
(108)	T2D olan 40 hasta	<i>L. planatarum</i> A7	8 hafta	Metilasyon süreçlerinde, SOD ve 8-OHDG'de azalma,
(109)	T2D olan 45 hasta	<i>L. acidophilus</i> La-5, <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12	6 hafta	HbA1c, TC ve LDL kolesterol düzeyleri arasında gruplar arasında anlamlı farklılık
(110)	T2D olan 44 hasta	<i>L. acidophilus</i> La-5, <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12	8 hafta	HDL kolesterol düzeylerinde artış ve LDL/HDL oranlarında azalma
(111)	T2D olan 64 hasta	<i>L. acidophilus</i> La5, <i>B. lactis</i> Bb12	6 hafta	Açlık kan glikoz ve antioksidan düzeylerinde azalma
(112)	T2D olan 60 hasta	<i>L. acidophilus</i> La5, <i>B. lactis</i> Bb12	6 hafta	TC ve LDL kolesterol düzeylerinde azalma
(113)	T2D olan 45 erkek hasta	<i>L. acidophilus</i>	4 hafta	Etki görülmedi
NCFM				

Tablo 2.4. (Devam) Probiyotiklerin insan sağlığı üzerindeki etkilerini araştıran bazı klinik çalışmalar.

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD)				
(114)	NAFLD olan obez 20 çocuk	<i>L. rhamnosus</i> GG	8 hafta	ALT ve PG-PS IgA antijenlerinde azalma
(115)	NAFLD olan 28 birey	<i>L. bulgaris</i> , <i>S. thermophilus</i>	12 hafta	ALT ve gama-GTP düzeylerinde azalma
(116)	NAFLD olan 72 hasta	<i>L. acidophilus</i> La5, <i>B. breve</i> subsp. <i>lactis</i> Bb12	8 hafta	Serum ALT, ASP, TC ve LDL kolesterol düzeylerinde azalma
(117)	NAFLD olan 44 obez çocuk	<i>Bifidobacterium</i> , <i>ALctobasillu</i> , <i>S. termoifilus</i>	16 hafta	Yağlı karaciğer şiddetinde gelişme, BKİ'nde azama ve GLP1/aGLP1'de artış
İrritable bağırsak sendromu (IBS), gastrintestinal hastalıklar, Helicobakter eliminasyonu, İnflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD), diyare				
(118)	H. pylori'si olan 59 yetişkin birey	<i>L. acidophilus</i> La5, <i>B. lactis</i> Bb12	6 hafta	Helicobacter pylori'ye karşı inhibitör etki
(119)	H. pylori'si olan 16 birey	<i>L. casei</i> Shirota	6 hafta	Helicobacter pylori gelişimine karşı inhibitör etki (probiyotik verilen grupta yaklaşık %64, kontrol grubunda ise yaklaşık %33 oranında)
(120)	Orta kulak iltihabı ya da solunum yolu enfeksiyonu olan 269 çocuk	<i>S. cerevisiae</i> (<i>boulardii</i>)	Bilgi yok	Diyare görülme sıklığı, probiyotik verilen grupta (%7.5) plasebo gruba (%23) kıyasla daha az bulundu. Herhangi bir yan etki gözlenmedi.
(121)	Ülseratif kolit olan 77 hasta	Probiotic VSL#3	12 hafta	Probiyotik verilen grubun %42.9'unda, plasebo grupta ise %15.7 oranında remisyon
(122)	İntestinal koliti olan anne sütü almış 90 yeni doğan	<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	6 ay	Bir haftalık kullanımdan sonra intestinal kolitle ilişkili semptomlarda ve ağrıda azalma

Tablo 2.4. (Devam) Probiyotiklerin insan sağlığı üzerindeki etkilerini araştıran bazı klinik çalışmalar.

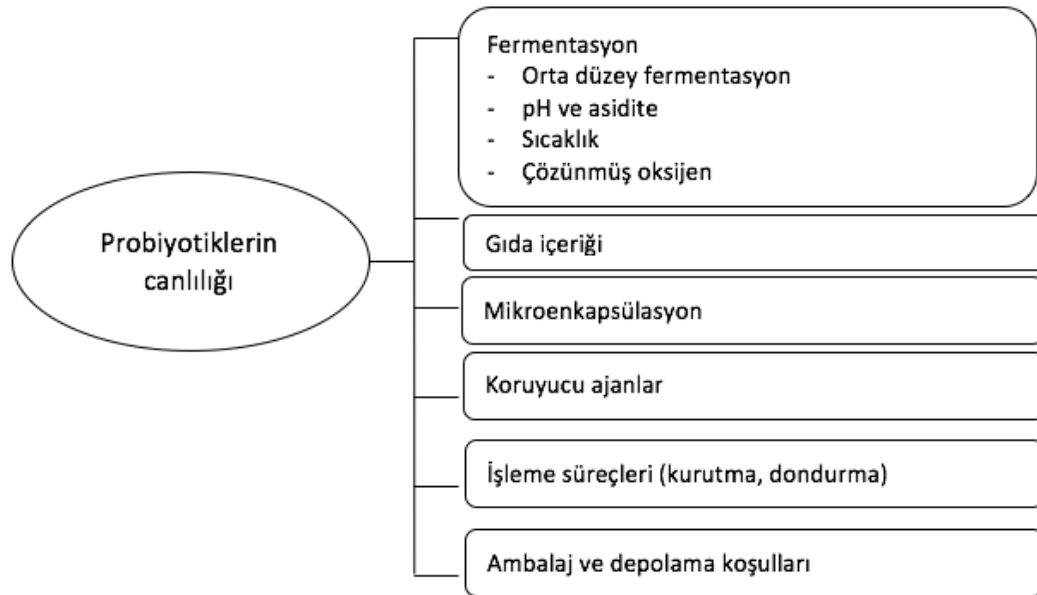
Atopik dermatit (AD)				
(123)	512 gebe kadın ve katılımcıların 474 yenidoğan bebeği	<i>L. rhamnosus</i> HN001	Kadınlar- 35 haftalık gebelik döneminden altı aylık emzirme dönemine kadar; bebekler- doğumdan 2 yaşına kadar	Bebeklerde egzamanın kümülatif prevelansında belirgin bir azalma
(124)	Orta şiddette atopik dermatiti olan 53 çocuk	<i>L. fermentum</i> VRI 033 PCC™	8 hafta	SCORAD'da azalma
(125)	156 tane yüksek risk altında olan (ailesinde alerjik hastalığı olan) çocuklar ve anneleri	<i>B. bifidum, B. lactis, L. lactis</i>	Anneler- gebeliğin son 6 haftası bebekler- 12 ay	Probiyotiğin, bebeğe doğumdan sonraki 3 ay içinde verildiğinde, en az 2 yıl boyunca egzama için yüksek riskte anlamlı azalma
(126)	Atopik dermatiti olan 50 çocuk	<i>B. animalis</i> subsp <i>lactis</i>	8 hafta	IFN-gama ve IL-10 düzeylerinin iyileşmesi sonucu AD şiddetinde anlamlı azalma
Laktoz intoleransında azalma				
(127)	Laktoz sindirim bozukluğu olan 15 sağlıklı yetişkin birey	<i>S. lactis, L. plantarum, S.</i> <i>cremoris, L. casei, S. diacetyllactis,</i> <i>S. florentinus, L. cremoris</i>	1 gün	Laktoz sindiriminde ve toleransında iyileşme
(128)	44 hasta	<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> IM386 (DSM 26137), <i>L. plantarum</i> MP2026 (DSM 26329)	6 hafta	Diyare ve mide gazında anlamlı azalma

Tablo 2.4. (Devam) Probiyotiklerin insan sağlığı üzerindeki etkilerini araştıran bazı klinik alışmalar.

Farklı kanser türleri ve kanserle ilişkili yan etkiler				
(129)	100 kolorektal karsinomu olan hasta	<i>L. plantarum</i> CGMMCC No 1258, <i>L. acidophilus</i> LA-11, <i>B. longum</i> BL-88	16 gün	Gut mukozal bariyer sağlamlığında artış ve enfeksiyon komplikasyonlarında azalma
(130)	Servikal kanseri olan hastaların radyoterapi süresinde diyaresi olan 63 hasta	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i>	7 hafta	Diyare insidansında azalma ve gaita kıvamında iyileşme
(131)	Kolorektal kanseri 150 hasta	<i>L. rhamnosus</i> 573	24 hafta	Diyare şiddetinde, abdominal rahatsızlıkta ve hastane bakımına ihtiyaç duymada azalma, bağırsak toksisitesine bağlı olarak kemoterapi dozunda azalma

2.6. Probiyotiklerin Canlılığını Etkileyen Faktörler

Probiyotik bakterilerin yapılan çalışmalarda belirtilen farklı birçok olumlu etkiyi gösterebilmesi ve hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde rol oynayabilmesi için canlılığını bağırsağa ulaşana kadar belli bir düzeyde koruması gerekmektedir (132). Bu yüzden uygun probiyotik bakteri seçiminde canlılığını koruyabilme yeteneği ve metabolik aktivite özellikleri en önemli kriterlerdir (133). Probiyotik içeren ürünlerin üretiminden tüketiciye ulaşana kadar geçen her aşamada probiyotiklerin canlılığını etkileyecek birçok faktör vardır. Besine bağlı etmenler (pH, moleküler oksijen, su aktivitesi, tuz varlığı, şeker ve hidrojen peroksit, bakteriyosin, yapay tatlandırıcılar ve renklendirici maddeler gibi kimyasallar), işleme süreçlerindeki parametreler (ısı işlemler, inkübasyon sıcaklığı, ürünlerin soğutma dereceleri, ambalaj materyalleri ve depolama yöntemleri ve ürün çeşitleri) ve mikrobiyolojik parametreler (probiyotiklerin türü, inokülasyon hızı ve oranı) etkileyen temel etkenler arasındadır (Şekil 2.1) (16, 25, 134, 135).



Şekil 2.1. Probiyotiklerin canlılığını etkileyen etmenler.

2.6.1. Besin İşleme

Besin işleme, besin güvenliğini sağlamak için zararlı mikroorganizmaların yok edilmesi ve patojenik kontaminasyonların önüne geçilmesi için uygulanan işlemlerdir.

Fakat probiyotik bakterilerin çevre koşullarına oldukça duyarlı olduğu düşünüldüğünde, canlılıkları bu işlemlerden oldukça fazla etkilenmektedir. Örneğin, besinlerin raf ömrünü uzatmak için kullanılan en yaygın yöntemler; ısı işlem ve kurutma yöntemleridir. Fakat bu iki yöntem de probiyotiklerin canlılığını büyük oranda olumsuz etkilemektedir. Diğer bir problem, probiyotikler bir besine eklendiğinde çoğalmalarının sınırlandırılmasıdır. Probiyotik bakterilerin yerine bazı bakterilerin gelişmesi, ürünlerin bozulmasına neden olabilir (135).

Özellikle fermente süt ürünlerinde probiyotik bakterilerin gelişimini etkileyen; asidite, pH, hidrojen peroksit, depolama sıcaklığı, diğer tür ve suşların varlığı, laktik ve asetik asit konsantrasyonu ve whey proteininin konsantrasyonu, diğer olumsuz etkenler arasında gösterilmektedir (136-139).

2.6.2. Mide Asidi

Mide pH'sı 2'nin altında olduğu için probiyotiklerin asiditeye karşı gösterdikleri tolerans, canlılık düzeylerini önemli oranda etkiler. *L. asidophilus*, pH 2.0'ye karşı dirençlidir ve nötre yakın pH'ya sahip sitoplazmada canlılıklarını sürdürebilirler (140). İnsan gastrointestinal sistemden izole edilen *Laktobasillus GG* türlerinin farklı pH değerlerine sahip gastrik sıvıdaki canlılıklarının incelendiği bir çalışmada, pH 1'de canlılığını hızlıca kaybettiği fakat pH 3 ile 7 arasında 4 saatlik müdahale sonunda canlılıklarında ciddi bir azalma olmadığı gözlenmiştir (141). Bakterilerin asiditeye karşı toleransı; çevresel strese karşı korunmasından sorumlu genlerin up-regülasyonunun sağlanması veya asidik çevreye karşı adaptasyonun sağlanması gibi farklı yöntemler kullanılarak geliştirilebilir. Bifidobakterilerin asit ve safraya karşı tolerasyonu farklı türlere göre değişiklik göstermektedir. *B. longum*, *B. pseudolongum* ve *B. animalis* türleri yüksek asiditeye karşı dirençlidir (137, 140). EcN probiyotik bakterilerinin aside karşı dayanıklılığının değerlendirildiği bir çalışmada da; EcN'nin pH 1,5'a duyarlı olduğu fakat pH 2'de canlılığını koruduğu gösterilmiştir (142).

2.6.3. Safra Tuzu

Probiyotik bakterilerin önemli özelliklerinden biri; ince bağırsağa kadar canlı olarak ulaşarak burada safra tuzuna karşı direnç gösterebilme yetenekleridir (143).

Haller ve arkadaşları (144) bağırsaktan elde edilen lactobasil türlerinin, fermente besinlerden elde edilen lactobasil türlerine göre safraya direncinin daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Fermente besinlerle oral olarak alınan *L. asidefilus*'un intestinal geçişi boyunca sadece %1.5'inin canlılığını koruduğu belirtilmiştir. Bazı lactobasil türlerinin safra stresine karşı dirençli olduğunu bu yüzden probiyotik bakteri olarak iyi bir seçim olabileceği bildirilmiştir. Bu türlerin safra tuzu hidrolaz enzimini kullanarak safra asidini dekonjüge edebilme yeteneği vardır (140, 145). Farklı lactobasil türlerinin safra tuzuna karşı dirençlerinin değerlendirildiği bir çalışmada; LGG'nin %0.5, %1 ve %2 oranlarında safra tuzu çözeltilerindeki canlılıklarını üçer saat aralıklarla değerlendirmişlerdir. Üç saatin sonunda %0.5 ve %1'lik çözeltideki bakterilerin canlılık düzeyleri 8 log (kob/mL)'un altında, %2'lik çözeltideki canlılık düzeyleri ise 7 log (kob/mL)'un altında bulunmuştur. Çalışmanın sonunda LGG bakterilerinin %2'lik safra tuzuna daha duyarlı olduğu belirtilmiştir. Bunun yanı sıra çalışmada, 6 ve 12. saatlerde bakterilerin ortama adaptasyon sağladığı için canlılığının daha yüksek olduğu gösterilmiştir (146). Bifidobakterilerin farklı alt türlerine göre safra tuzuna karşı duyarlılığı farklıdır. *B. longum*'un %4.0'lük safra konsantrasyonunda bile canlılığını devam ettirebildiği gösterilmiştir (137). EcN probiyotik bakterilerinin; %0.1, %0.3 ve %0.5 safra tuzu içeren PBS çözeltisi içerisinde canlılığının etkilenmediği belirtilmiştir (142).

2.6.4. Oksijen İntoleransı

Oksijen içeriği ve redoks potansiyeli, probiyotik bakterilerin canlılığını önemli ölçüde etkilemektedir. Anaerobik bakteriler; hem intestinal mikrobiyal ekosisteminde hem de egzogenik oksidatif stres durumlarında oksijeninin varlığından doğrudan etkilenir (140). Yapılan bir çalışmada, yoğurttaki bulunan *L. asidefilus* canlılığının, ambalajın oksijen geçirgenliğiyle yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (138). Anti-oksidatif tür olan *L. fermentum*'un, oksidatif olmayan türlere göre oksijen varlığında canlılığını daha fazla koruduğu belirtilmiştir (147). Bifidobakteri türleri ise anaerobiktir (140). Yapılan bir çalışmada; *B. longum*'un oksijen varlığında, gelişiminin sınırlandığı ve sellüler yağ asidi profili değiştiği için hücre morfolojisinin de değiştiği gösterilmiştir (148).

2.6.5. Diğer Faktörler

Besinlerin doğal yapıları, gastrointestinal sistemden geçişleri sırasında probiyotiklerin canlılığını etkilemektedir. Örneğin meyvelerde bulunan selüloz, probiyotiklerin bağırsak geçişi sırasında koruyucu etki gösterir. Peynirlerin de probiyotik bakterilerin taşınmasında etkili bir alternatif olacağı belirtilmektedir. Çünkü yüksek pH ve yağ içeriğine, katı bir yapıya ve yüksek tamponlama yeteneğine sahiptir. Tüm bu özellikler bakterilerin korunmasında etkilidir (149).

Probiyotik içeren ürünlerin nem içeriği ve su aktivitesi raf ömrü boyunca bakterilerin canlılığını etkiler. Kurutma işleminden sonra besinde kalan su miktarı bakterilerin depolama boyunca canlılığını daha hızlı kaybetmesine neden olur. Bunun yanı sıra probiyotik içeren ürünlerin bulunduğu ortamın nemi de, su mobilitesini ve canlılığı kaybetme hızını artırır. Ambalajın probiyotiklerin canlılığı üzerindeki etkisi, ambalajın oksijen ve diğer gazları geçirgenliğine bağlıdır (16).

Besinlerin işleme ve üretim aşamalarında ya da sindirim boyunca olumsuz birçok durumla karşılaşıldığı için, probiyotiklerin bu çevre koşullarına karşı direnç geliştirmesi gerekmektedir. Bunun için; asit ve safraya karşı dirençli olan türlerin seçilmesi, oksijen geçişini engelleyen ambalajların kullanılması, iki basamaklı fermentasyon, çeşitli stres durumlarına karşı pre-adaptasyon, aminoasit ve peptid formunda mikro besin öğelerinin eklenmesi ya da mikro ya da nanoenkapsülasyonunun yapılması gibi alternatif çözümler sunulmaktadır. Bunlar arasında en etkili korumanın, probiyotiklerin enkapsülasyonu ile sağlanacağı belirtilmektedir (135, 139).

2.7. Enkapsülasyon İşlemleri

Enkapsülasyon; besinlerde bulunan aktif bileşenlerin kimyasal ve çevresel faktörler (sıcaklık, pH, enzimler ve oksijen) gibi olumsuz koşullardan korunması ve kontrollü salınımının gerçekleştirilebilmesi için bariyer oluşturulması sürecidir (150, 151). Gıda endüstrisinde biyoaktif bileşenlerin ve probiyotiklerin korunması için birçok farklı enkapsülasyon yöntemi geliştirilmiştir. Uygun yöntem seçiminde; enkapsülasyonda kullanılacak olan materyalin türü ve enkapsüle bileşenin eklendiği son ürünün özellikleri kritik önem taşımaktadır. Kapsül duvar materyalinin seçimi de;

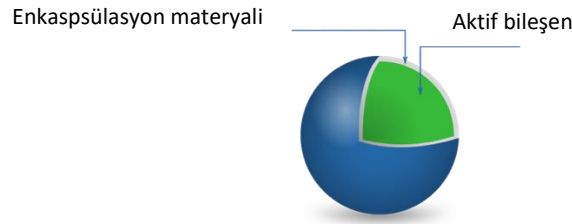
enkapsüle edilmiş bileşenin özelliklerini ve enkapsülasyonun etkinliğini etkilediği için dikkatli şekilde yapılmalıdır (152).

İnsan tüketimine sunulacak olan enkapsülasyon materyallerinin GRAS olarak kabul edilmesi gerekmektedir (153). Enkapsülasyon için en sık kullanılan materyaller; protein ve karbonhidrat polimerleridir. Son ürünün özelliklerinin belirlenmesinde bu materyaller etkin rol oynar. Kapsül partiküllerinin boyutu, şekli ve yapısını, üretim, depolama ve tüketimi süresince stabilitesini ve istenildiği durumlarda kontrollü salınımının gerçekleşmesini etkiler (154, 155). Biyoaktif bileşenlerin enkapsülasyonun birçok avantajı vardır; ürünlerin istenen şekilde tüketiciye ulaşmasını, biyoyararlılığının artırılması ya da canlılığının korunmasını, zamanla üründe oluşabilecek kimyasal değişimler sonucu istenmeyen veya zararlı bileşiklerin oluşumunun önlenmesini ve bazı istenmeyen tat ve kokuların maskelenmesini sağlar. Genellikle karşılaşılan dezavantajları ise; kapsüllerin polimer matrikslerinin stabilitesi ve mikro boyuttaki materyalin çoklu üretimindeki zorluklardır (156, 157). Enkapsülasyon teknolojisinin iki temel yöntemi vardır; mikroenkapsülasyon ve nanoenkapsülasyon. Her ikisi de üretilecek olan ürünün fonksiyonelliğini farklı şekillerde etkilemektedir (15).

2.7.1. Mikroenkapsülasyon

Mikroenkapsülasyon, kontrollü salınım gerektiren ve bazı olumsuz koşullarda çok küçük bir kapsülün içerisinde, katı, sıvı ve gaz bileşenlerinin kaplanması teknolojisidir. Mikrokapsüller, katı veya sıvı çekirdeği birkaç mikron ile 1 mm arasında değişen bir çapta çevreleyen, ince, küresel, sert ve yarı geçirgen bir zarıdır. Kapsüller kaplama; pH, oksijen ve asidite gibi çevresel strese karşı çekirdekte bulunan aktif bileşenleri korur ve sindirim sisteminden geçişi kolaylaştırır. Enkapsülasyon işlemiyle; bakterilerin canlılığının korunması, dozun kontrol edilmesi ve hücrelerin manipülasyonu sağlanır (158).

Mikroenkapsüle edilen materyal çekirdek (core), iç faz ya da dolgu olarak adlandırılırken; dış kısımda bulunan kısım duvar ya da membran olarak adlandırılmaktadır (159) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Mikroenkapsülasyon

Probiyotiklerin mikroenkapsülasyonu için genellikle uygulanan teknikler; emülsiyon, ekstrüzyon, püskürterek kurutma ve püskürterek dondurma teknikleridir (158, 160, 161). Emülsiyon yöntemiyle daha küçük boyutta kapsüller üretilebildiğinden probiyotik bakterilerin mikroenkapsülasyonunda genel olarak bu yöntem kullanılmaktadır (162). Probiyotiklerin enkapsülasyonunda farklı birçok materyal, birlikte ya da tek başına kullanılmaktadır. kapsülasyon materyali olarak çalışmalarda genellikle; aljinat ve türevleri, karregen ve karışımları, ksantan-jelan karışımları, kitosan, jelatin, dirençli nişasta, whey proteinleri, polimerize whey proteinleri, kazein tercih edilmektedir (150, 163-165). Kullanılacak olan materyalin etkinliği; kapsülü kaplama yeteneğine ve canlılığı geliştirmesine yanı sıra ulaşılabilirliğine, maliyetinin düşük olmasına ve biyo uyumluluğuna bağlıdır (166).

Ekstrüzyon Yöntemi

Ekstrüzyon yöntemi, hidrokolloitlerin kaplama materyali olarak kullanıldığı en yaygın ve en eski yöntemdir (167). Kalsiyum, potasyum gibi minerallerin varlığında jel forma dönüşen aljinat, karregen ve pektin gibi bazı polimerler, ekstrüzyon yöntemiyle probiyotiklerin başarılı bir şekilde enkapsüle edilmesinde kullanılmaktadır. Jel formu oluşturan materyallerin kullanılmasındaki temel sebep; jelleşmiş olan iyonlar tarafından, çoklu serbest karboksilik radikallerin bağlanabilmesidir. Böylece jel formda bağlanmış yapılar elde edilerek başarılı bir mikroenkapsülasyon gerçekleştirilir (168). Bu yöntem, uçucu ve stabil olmayan aroma maddelerinin ve yağların kapsüllemesi için uygun bir yöntemdir. Kapsüllemeyle oksijen geçişi tamamen engellendiği için ürünlerin raf ömrü etkili bir şekilde uzatılır (169).

Ekstrüzyon yönteminin en büyük avantajı; duvar-çekirdek özellikleridir. Enkapsüle edilen materyal duvar materyali ile tamamen kaplanmıştır ve yüzey çekirdek materyali dehidre edici bir sıvıyla (genellikle isopropil alkol) uzaklaştırılır. Yüzey çekirdek materyali, üründe istenmeyen duyuşsal özelliklerin ortaya çıktığı durumlarda önemlidir. Karbonhidrat kullanılarak kaplama, oksijene karşı çok iyi bir bariyer oluşturur ve bu durum da ürünlerin raf ömrünün uzamasına neden olur (170).

Ekstrüzyon yönteminin dezavantajı ise, kapasitesinin düşük olmasıdır. Yüksek kapasite çekirdeğin duvar materyaline oranının yüksek olması anlamına gelir ve ekonomik olmasının yanı sıra duyuşsal özellikleri açısından da önemlidir. Kapasiteyi arttırmak için yapılan uygulamalar mikrokapsüllerin stabilitesini olumsuz etkiler ve çekirdek materyalinde kayba neden olur. Diğer dezavantajları ise; karbonhidratların hasara ve yapısal bozulmalara duyarlı olması, daha büyük partikül dağılımının olması ve duvar materyal alternatifinin sınırlı olmasıdır (169, 170).

Emülsiyon Yöntemi

Bu yöntem, kalıcı ya da geçici emülsiyon oluşturmak için sürekli fazdan ya da dağılıma fazından oluşan bir yöntemdir. Bu fazların ardından ayrışma fazı gelir, fazlar birbirinden ayrılır ve dağılıma fazı çekirdek materyal olarak probiyotik bakterileri enkapsüle eder (171). Sodyum aljinat, çalışmalarda en sık kullanılan materyaldir. Bir iğne yardımıyla püskürtme ya da damlatma yerine, dağılıma fazı olarak sodyum aljinat, herhangi bir bitkisel yağ içerisinde emülsüfiye edilir. Sonrasında kalsiyum klorür çözeltisi yavaşça eklenerek sertleşmesi sağlanır. Sonunda oluşan kapsüller filtrasyonla toplanır ya da orta şiddette santrifüj edilir (172). Bu işlemle birlikte, ekstrüzyon yöntemine kıyasla daha küçük kapsüller elde edilir. Endüstriyel açıdan bakıldığında da daha büyük ölçekli üretimlerde kullanımı daha kolaydır. Partiküllerin boyutları; çalkalama hızına ve homojenizasyon parametrelerine bağlı olarak belirlenebilir (135). Konuyla ilgili yapılan bir çalışmada; mısır özü yağında sodyum aljinatın emülsiyonu, mikrogözenekli cam membrandan geçirilerek yapılmış ve *L. casei* YIT 9018 hücrelerinin enkapsülasyonunda kullanılmıştır. Çalışmanın sonunda küçük partikül boyutuna sahip ve stabilitesi yüksek ürünler elde edilmiştir. Çalışmada ayrıca enkapsüle edilen ürünlerin, enkapsüle edilmeyen ürünlere kıyasla; *in vitro* gastrik koşullarda, safra tuzuna karşı ve farklı sıcaklıkta depolama koşullarında etkinliklerinin

daha yüksek olduğu gösterilmiştir (173). Emülsiyon yönteminde aljinattan farklı yaygın olarak kullanılan diğer materyaller; k- karregen ve keçiyoynuzu gum karışımı, kitosan, jelatin ve selüloz asetat fitalattır (135).

Literatürde aljinattan farklı materyaller kullanılarak başarılı mikroenkapsülasyonlar yapılmıştır (174, 175). Adhikari ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (175), %2 k- karegen ve %0.9 NaCl karışımı, bitkisel yağ içerisinde dağıtılmış ve emülsifikasyon için Tween 80 kullanılmıştır. Ardından karışım, potasyum klorid ile sertleştirilmiştir. Serbest halde ve enkapsüle edilmiş *B. longum* hafif asidik ortam olan yoğurda eklenmiş ve 30 gün boyunca buzdolabı koşullarında depolanmıştır. Yapılan canlılık analizlerine göre; enkapsüle bakterilerin canlılık düzeylerinin, serbest haldeki bakterilere kıyasla %70.5 daha fazla olduğu bulunmuştur. Emülsiyon yönteminin materyaller açısından birçok alternatif sunması nedeniyle araştırmacılar tarafından kazein gibi diğer hidrokolloidlerin mikroenkapsülasyonda kullanılmasına yönelik yapılan çalışmalar artmıştır (135).

Püskürterek Kurutma

Sprey kurutma kullanılarak mikroenkapsülasyon 1950 yılından beri; aromatik yağlar, vitaminler, mineraller, balık yağı ve probiyotik bakteri gibi farklı birçok besin bileşeni için kullanılmaktadır (170, 176). Probiyotik bakterilerin püskürterek kurutma yöntemiyle mikroenkapsüle edilmesi; mikroenkapsüllerin fiziksel hasarına, bakteri hücrelerinin ortaya çıkmasına ve kurutma işlemi boyunca ısıya maruz kaldığı için bakterilerin canlılığını büyük oranda etkiler (177). Bakteri hücre ölümlerini azaltmak için; dondurarak kurutma süresinde uygun kriyoprotektan karışımların kullanılması, püskürterek kurutma işlemi için başlangıç ve sondaki sıcaklıkları optimize edilmesi ve ani ısı değişimlerinin minimize edilmesi gibi bazı önlemler alınmaktadır (168). Fakat püskürterek kurutma yönteminde asıl sorun, duvar materyalinin seçimidir. Duvar materyalinin püskürterek kurutmanın yapılabilmesi için suda çözünür olması gerekir fakat bu durum çekirdek materyalin sulu ortamlarda açığa çıkmasına neden olarak kontrollü salınımın gerçekleşmesine olanak tanımaz (135).

Oktil-benzeri nişasta (octyle-substituted starches) gibi bazı hidrofobik polisakkaritler püskürterek kurutma yönteminde başarılı bir şekilde duvar materyali olarak kullanılmaktadır (170). Kakule yağı için bir çeşit gum (Mesquite gum) (178) ve

Enterococcus faecium için ise dekstran ve polivinil piroolidon karışımının (179) püskürterek kurutma ile mikroenkapsülasyonda etkili bir duvar materyali olduğu gösterilmiştir. Kakule yağının gum ile %83.5'inden daha fazla oranda enkapsüle edildiği ve tadının da istenildiği şekilde maskelendiği belirtilmiştir. Her iki çalışmada da duvar materyalinin sulu ortamlarda çözündüğü ve kontrollü salınımın gerçekleşmediği bildirilmiştir.

Püskürterek Dondurma

Bu yöntem probiyotik bakterilerin mikroenkapsülasyonundan ziyade daha çok diğer besin ögeleri için kullanılmaktadır (168). Bu yöntem; katı çekirdek materyal üzerine lipit bazlı kaplama materyalinin püskürtülmesini içerir. Bu şekilde karışma ve kaplama işlemi gerçekleşir. Kaplama materyalinin sıcaklığı, lipitlerin erime sıcaklığının üstünde tutulur fakat çekirdek materyalindeki hızlı sıcaklık artışının önlenmesi gerekir. 10°C ile 50°C arasındaki soğutucu hava, kaplamanın sertleşmesi ve lipitlerin katılaşması için kullanılır. Bu süreç partiküllerin çift kaplama yapılması için de uygundur. İlk tabaka olarak lipitler, ikinci tabaka olarak da protein ya da gular kullanılmaktadır (180). Bu protein ve gular, ürünün stabilizasyonunu ve yoğunluğunun ayarlanmasını sağlar. Püskürterek soğutma işlemi; vitaminlerin, minerallerin, asitlik düzenleyicilerin, diğer dondurulmuş sıvıların ve ısıya duyarlı materyallerin enkapsüle edilmesinde başarılı olarak uygulanmaktadır (135, 181).

2.7.2. Nanoenkapsülasyon

Nanoenkapsülasyon; nanokompozit, nanoemülsifikasyon ve nanoesterifikasyon gibi teknikler kullanılarak daha küçük yapılar oluşturulup istenen maddelerin kaplanmasını sağlayan ve çekirdek materyalin kontrollü salınımı da dahil son ürünün fonksiyonelliğinin arttırıldığı bir teknoloji olarak tanımlanmaktadır (182). Bu teknoloji son yıllarda; vitamin, antioksidan, protein, lipitler ve karbonhidratlar gibi biyoaktif bileşenlerin olumsuz koşullardan korunmuş, fonksiyonelliği arttırılmış ve stabilitesi geliştirilmiş ürünlerin üretilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır (183). Sağlık üzerine olumlu etki gösterebilmesi için belirli düzeylerde alınması gereken biyoaktif bileşenlerin, kullanılacak miktarlarının nanoteknoloji ile azaltılması sonucu bu teknolojinin gıda sektöründeki önemi giderek artmaktadır (182).

Yapılan çalışmalarda, nanokapsüllerin üretilmesi için farklı yöntemler geliştirilmekte ve farklı materyaller kullanılmaktadır (182, 183). Nanokapsüllerin istenen koşullarda kırılması sağlanarak aktif bileşenlerin ortaya çıkması ve diğer besinler gibi emilim ve sindiriminin gerçekleşmesi sağlanır (182). Lipit bazlı nanoenkapsülasyon sistemleri; çözünürlüğü ve biyoyararlılığı arttırarak, *in vivo* ve *in vitro* stabiliteyi sağlayarak ve diğer besin bileşenleriyle istenmeyen tepkimelerin oluşmasını engelleyerek antioksidan aktivitenin artmasını sağlayabilir. Besinlerin ve nutrasötiklerin taşınması ve korunması için kullanılan lipit bazlı nanoenkapsülasyon sistemleri; nanolipozomlar, nanokoklearlar ve arkeozomlardır. Nanolipozom teknolojisi; duyarlı bileşenlerin enkapsülasyonu, kontrollü salınımı, biyoyararlılığı, stabilitesi ve raf ömrünün geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca besin öğelerinin, nutrasötiklerin, enzimlerin, gıda katkı maddelerinin ve besin antimikrobiyallerinin taşınmasında da araç olarak kullanıldığı rapor edilmiştir (184).

Probiyotikler gıda sektöründe genellikle; yoğurt, yoğurttan elde edilen ürünler, süt, peynir, meyve içerikli ürünler ve süt içeren ürünlere ilave edilmektedir. Bu ürünlerdeki bileşenlerin enkapsüle edilmesi, ürünlerin raf ömrünün arttırılmasını sağlayabilir. Nanoenkapsülasyon, probiyotik bakterilerin gastrointestinal sistemde istenen bölgelerde salınımının sağlanması için spesifik reseptörlerle etkileşime geçmesine olanak sağlar (185).

Gıda uygulamalarında nano boyutta enkapsülasyon materyali üretimi için karbonhidrat, protein ve lipit bazlı materyaller en uygun olanlarıdır (186). Polisakkarit bazlı materyaller; canlı organizmalarla ve yaşayan sistemlerle uyumlu, biyoçözünür edilebilir ve gerekli özelliklerin kazandırılması için kolay modifiye edilebilir olduğu için gıda endüstrisinde yaygın olarak tercih edilmektedir. Lipit bazlı materyallerin aksine, karbonhidrat bazlı olanlar yapılarındaki fonksiyonel gruplar nedeniyle birçok biyoaktif bileşikle etkileşime girebilir ve bu durum da hidrofilik ve hidrofobik biyoaktif bileşenlere bağlanmasını kolaylaştırabilir. Lipit ve protein bazlı materyaller yüksek sıcaklıkta kolay denatüre olabilir ya da eriyebilirler. Bu nedenle karbonhidrat bazlı materyaller, yüksek sıcaklık uygulaması gereken süreçlerde daha uygun bir kaplama materyalidir (35).

Farklı materyaller kullanılarak biyoaktif bileşenlerin enkapsülasyonu için farklı birçok yöntem geliştirilmiştir (187).

Koaservasyon Yöntemi

Koaservasyon yöntemiyle nanoenkapsülasyon, karbonhidrat kaynaklı materyallerin kullanılabilirdiği en kolay yöntemlerden biridir. Bu yöntemde genellikle iki zıt yüklü molekül arasındaki elektriksel etkileşimden yararlanır. Yüklü biyoaktif bileşen ile zıt yüklü karbonhidrat arasındaki çekim ile bileşenler uyarılır (basit koaservasyon). Alternatif olarak, bir biyoaktif bileşen, pozitif yüklü (çitosan gibi) ya da negatif yüklü (pektin veya aljinat gibi) biyopolimerlerin elektrostatik kompleksleştirmeye oluşan partiküller içerisinde tutulabilir (kompleks koaservasyon). Üretilen nanokapsüllerin fonksiyonel performansı; biyopolimerik duvarın yüzey özellikleri ve kimyasal özelliklerine (yüzeyde bulunan yüksek yük nanoenkapsülasyon performansının daha iyi olmasına neden olur; yüzeydeki yük ise pH'a bağlıdır), çalkama hızına (çok düşük ya da çok yüksek hızla çalkama yapılması yığılmalara neden olabilir), polimer solüsyonun damla damla eklenmesinin hızına (hızın daha düşük olması performansın daha iyi olmasına neden olur) ve çözeltide biyoaktif ve biyopolimerlerin çözünürlüğüne (yüksek çözünürlük performansın daha iyi olmasına neden olur) bağlı olarak değişir. Bu yöntem hem polar hem de apolar biyoaktif moleküllerin nanoenkapsülasyonunda etkin bir şekilde kullanılmaktadır (24, 35).

Püskürterek Kurutma Yöntemi

Püskürterek kurutma yöntemi enkapsülasyon için en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Diğer yöntemlere kıyasla hızlı, ucuz ve tekrarlanabilir bir yöntemdir (188). Bu yöntemin prensibi; biyopolimer bir çözeltide aktif bileşenlerin çözünmesi ve dağılması temeline dayanmaktadır. Dağılma, sıcak bir hava içerisinde atomize edilerek yapılır. Burada çözelti hızlıca uzaklaşır ve poroz duvar materyali içinde gömülü olan aktif bileşenden oluşan kurutulmuş partikül üretilir.

Selülozun hidroksil grupları (selüloz asetat fitalat ve hidroksipropil metil üretmek için), çitosan (glikol çitosan üretmek için), beta-siklodekstrin (hidroksipropil-beta siklodekstrin üretmek için) gibi bazı fonksiyonel grupların eklenmesi ya da biyopolimerlerin depolimerizasyonu (örneğin guar gum), suda çözünürlüğü arttırabilir ve böylece ürünlerin istenilen bölgelere taşınmasını kolaylaştırabilir (35).

Bu yöntemin en büyük dezavantajı, biyoaktif materyalin ısıya karşı duyarlı olmasıdır. Bu yöntemde suda az çözünür bileşenler (çitosan veya selüloz gibi) kullanılması bu yöntemin diğer sınırlılıklarından biridir. Çünkü besin sistemlerinde genellikle su temelli dağılmalar kullanılmaktadır. Uygulama sırasında yüksek sıcaklığın kullanılması, nişasta gibi bazı karbonhidratların jelatinize olmasına neden olacağından, bu durumun üretim aşamasında sorun yaratabileceği bildirilmiştir. Diğer yandan sıcaklığa dayanıklı olan siklodekstrin gibi karbonhidrat biyopolimerleri ya da hidroksipropil selüloz gibi modifiye materyaller, yüksek sıcaklıkta püskürterek kurutma için uygundur (35).

Elektrospın ve Elektrosprey Yöntemi

Elektrospın yöntemi, biyoaktif bileşenlerin kapsüle edilmesi için birkaç nanometrenin altındaki boyutlarda sürekli fiberlerin üretilmesini içeren bir yöntemdir (189). Bu yöntemde polimer, fiber üretebilmek için elektrostatik kuvveti kullanır. Sistem; elektrospın edilecek olan sıvının pompalandığı şırınga pompa, polimer çözeltide yük oluşturulmasını sağlayan pozitif ya da negatif yüklü yüksek voltaj kaynağı ve topraklanmış bir kolektörden oluşmaktadır (190-192).

Bu sistemde sıvı fazdaki polimer, şırıngadan sabit basınç ve sabit hızda pompa ile basılarak enjektör ucunda damla oluşturulur. Enjektör ucunda sıvı halde bulunan polimer elektrik alanına maruz bırakıldığında Taylor konisi olarak bilinen yapı oluşur ve elektrik alan damlacık yüzey gerilimini aşacağı kritik bir değere ulaştığında yüklü polimer jetler elde edilir. Uygun parametrelerin seçilmesi sonucu kolektöre ulaşana kadar evapore olan jetler kolektörde fiber olarak toplanır (32, 193).

Farklı parametreler fiber oluşumunu ve yapısını etkiler. Bunlar; uygulanan voltaj (yüksek voltaj uygulanması başlangıçta ince fiberlerin oluşmasına daha sonrasında ise daha kalın fiberlerin oluşmasına neden olur), çözeltinin gönderilme hızı (yüksek hız fiberlerin daha ince olmasına neden olur), enjektörle kolektör arasındaki uzaklık (daha uzak olması daha ince fiberlerin oluşmasına neden olur), çözeltinin özellikleri (iletkenliği daha yüksek olan çözeltilerin seçilmesi, daha ince fiberlerin oluşmasına neden olur), polimer konsantrasyonu (daha düşük konsantrasyonlar daha ince fiberlerin oluşmasına neden olur) ve çözücünün uçuculuğudur (daha uçucu olan çözücüler kullanıldığında daha ince fiberler oluşur) (192, 194).

Bu yöntem; bifidobakterilerin, NiO/TiO₂, lizozomun ve epigallokateşin-3-gallat'ın enkapsülasyonunda kullanılmaktadır (35). Stijnman ve arkadaşlarının farklı polisakkaritleri kullanarak elektrospin yöntemine yönelik yaptıkları bir çalışmada; kullanılan polimerlerin, çözeltilerin ve kullanılan materyallerin özelliklerinin daha önemli olduğu, kullanılan ekipman parametrelerinin ise ikincil öneme sahip olduğu belirtilmiştir. Protokollerin optimize edilmesinde ise ekipman özelliklerinin daha önemli olduğu bildirilmiştir (195).

Elektrosprey yöntemi ise; elektrospinninge benzer ve nanoenkapsülasyonda kullanılan yeni bir yöntemdir. Elektrospinningden farklı olarak nanofiberlerin oluşumu yerine nanoparçacıklar oluşmaktadır. Bu yöntemde yüksek voltaj tarafından indüklenen elektrostatik kuvvet, damlacıklar içerisindeki sıvıyı atomize eder. Çözücünün buharlaştırılması, damlacıkların elektroda doğru iletilmesi sırasında gerçekleşir. Elektrosprey yönteminin en belirgin özelliği; etkin ve verimli kapsülasyona olanak sağlaması ve tek aşamada üretim imkanı sağlamasıdır (196, 197).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmanın Genel Planı

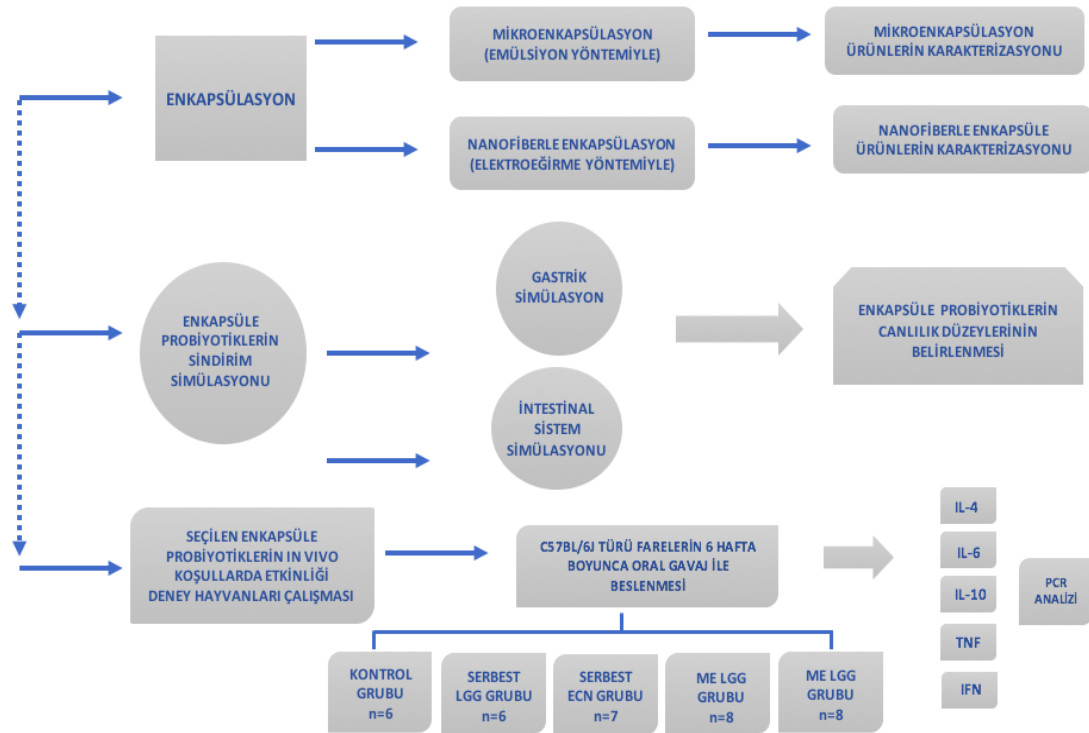
Bu çalışma farklı yöntem ve materyaller kullanılarak enkapsüle edilen farklı iki probiyotik bakterinin *in vitro* koşullarda etkinliği 2017-2020 arasında ve *in vivo* koşullarda etkinliği ise 2019-2021 yılları arasında değerlendirilmesi amacıyla yürütülmüştür. Çalışma üç aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk olarak belirlenen amaç ve hipotezler doğrultusunda iki farklı probiyotik bakterinin (*Escherichia coli* Nissle (EcN) ve *Lactobacillus rhamnosus* (LGG)) emülsiyon ve elektroğirme yöntemi ile enkapsülasyonu ve yöntemin etkinliği ve ürünlerin karakterizasyonu yapılmıştır.

Çalışmanın ikinci bölümünde enkapsülasyonu gerçekleştirilen bakterilerin *in vitro* koşullarda canlılığı analiz edilmiştir. *In vitro* yöntem için, ilk olarak farklı parametreler kullanılarak simüle mide çözeltisi ve simüle bağırsak çözeltileri hazırlanmıştır. Parametreler optimize edildikten sonra farklı iki yöntemle enkapsüle edilen probiyotik bakterilerin sindirim sistemi simülasyonu (mide ve ince bağırsak) süresince canlılıkları analiz edilmiştir. Bu bölümde farklı enkapsülasyon yöntemlerinin *in vitro* koşullardaki canlı kalma oranları tespit edilmiş ve yöntemler karşılaştırılmıştır.

Çalışmanın üçüncü kısmında enkapsüle probiyotik bakterilerin *in vivo* koşullarda farklı inflamasyon parametreleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Çalışmanın *in vivo* kısmına; *in vitro* çalışmasından elde edilen sonuçlar doğrultusunda canlılığı daha iyi koruduğu belirlenen mikroenkapsülasyon yöntemiyle üretilen probiyotiklerle devam edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen C57BL/6J türü 35 adet erkek fareye (randomize olarak beş gruba ayrılmış); mikroenkapsüle probiyotik bakteriler, serbest formda probiyotik bakteriler ve PBS oral gavaj ile altı hafta boyunca her gün verilmiştir. Çalışmanın sonunda farelerden elde edilen karaciğer dokularından inflamatuvar sitokin düzeylerinin analizi; PCR yöntemi ile yapılmıştır (Şekil 3.1).

Yapılan tüm müdahaleler Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu esaslarına uygun olarak yürütülmüştür. Bu çalışma için Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan gerekli etik onay alınmıştır (23.10.2018 tarihli ve 2018/67 -

06) (EK 1). Çalışmanın için gereken bütçe Hacettepe Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı ile desteklenmiştir (THD-2019-17899).



Şekil 3.1. Çalışma akış şeması.

(EcN, *E. coli Nissle*; LGG, *Lactobacillus rhamnosus*; ME, mikrokapsüle).

3.2. Probiyotiklerin Enkapsüle Edilmesi

3.2.1. Probiyotiklerin Hazırlanması

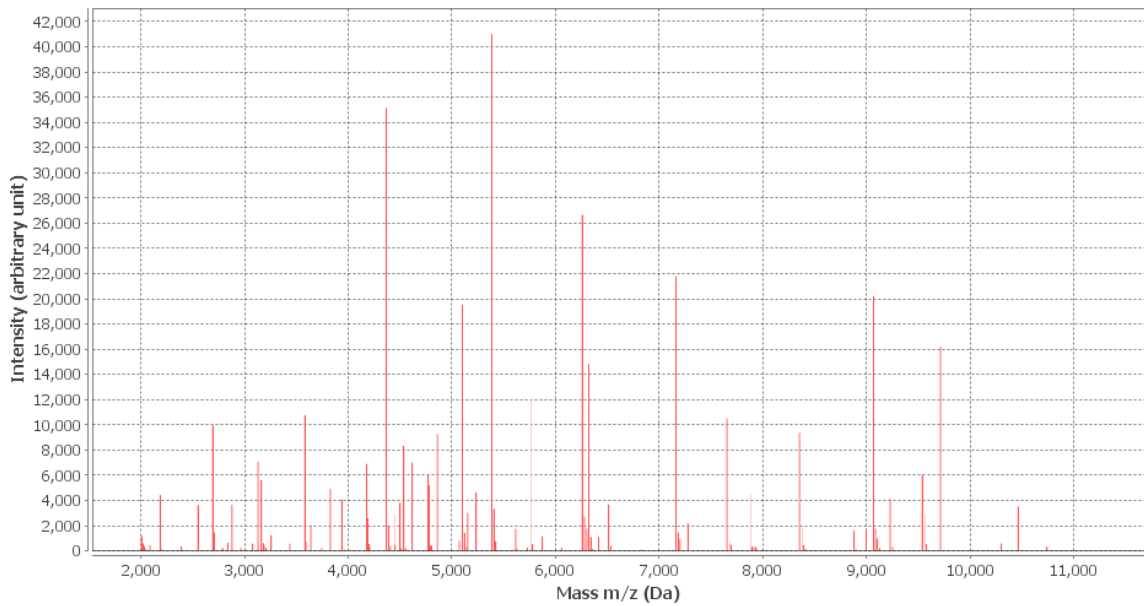
Çalışmada enkapsüle etmek üzere; immün sistem üzerinde olumlu etkilerinin olduğu birçok çalışmada gösterilen LGG ve özellikle gastrointestinal hastalıklarda semptomlar üzerinde olumlu etkilerinin olduğu gösterilen EcN probiyotik bakterileri seçilmiştir.

LGG probiyotik bakterileri; liyofilize formda Chr. Hansen ticari markadan (ATCC; 53103, Danimarka) temin edilmiştir. Probiyotiklerin canlandırılması için liyofilize formda olan LGG, 10 mL MRS broth içerisine eklenerek 37°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir (198). İnkübasyon sonrasında LGG için MRS agara tek

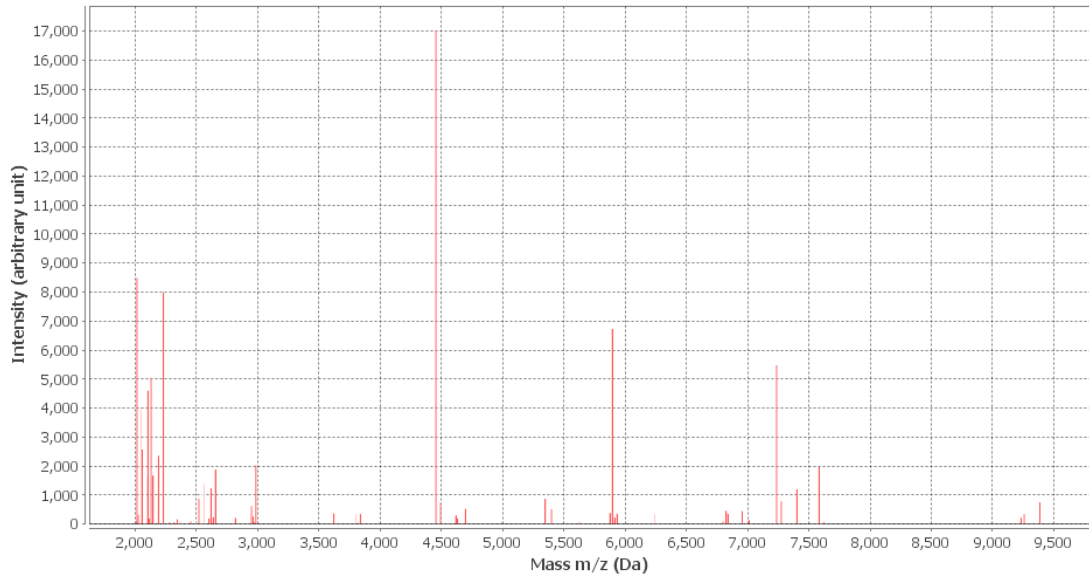
koloni düşürme yöntemiyle inoküle edilerek anaerobik koşullarda 33 °C’de bir gece inkübasyona bırakılmıştır.

EcN; liyofilize formda Mutaflor ticari markadan (Ardeypharm, Germany) temin edilmiştir. Bakterilerin canlandırılmasında, EcN’nin gelişimi için BHI (Brain-Heart Infusion, broth) (Acumedia, Neogen) kullanılmıştır (199). 10 mL BHI brotha eklenen liyofilize formdaki EcN probiyotik bakterileri, 37°C’de bir gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, TBX (Tryptone Bile X-glucuronide Agar) agara, benzer şekilde tek koloni düşürme yöntemiyle ekim yapılmıştır. Ardından aerobik koşullarda 33°C’de bir gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Kültürlerin saflık tayini için MALDİ-TOF analizi yapılmıştır. Önceden belirtildiği şekilde üretilen suşları tanımlamak için Vitek MS (BioMérieux) sistemi kullanılmıştır. Analiz edilen örnekler; 2-20 kDa kütle aralığında, pozitif lineer modda ve 337 nm arasında Nitrojen lazerine maruz bırakılmış ve örneklere ait spektrumlar elde edilmiştir (Grafik 3.1).



(a) *L. rhamnosus*

(b) *E. coli Nissle***Grafik 3.1.** Elde edilen spektradan örnekler.

Elde edilen spektrumlar MYLA yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Saf kültür tayini için yapılan MALDİ-TOF analizi sonucunda elde edilen veriler EK-2’de gösterilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda elde edilen kültürlerin herhangi bir şekilde kontamine olmadığı ve %99.9 oranında saf olduğu sonucuna varılmıştır.

Saflığı belirlenen probiyotik bakterilerden tek koloni seçilerek bakteri geliştirilmiş ve elde edilen bakteriler gliserolle karıştırılarak -20°C’de saklanmıştır. Çalışmanın devamında hazırlanan gliserollü stok çözeltileri kullanılmıştır.

Enkapsülasyon işlemlerinde kullanılmak üzere bakteri kültürünün canlandırılması için, bakteri stoklarından 200 µl EcN ve LGG bakterileri alınarak, sırasıyla NB broth (Merck, Darmstadt, Germany) ve MRS brotha (Biolife, Milano, Italy) eklenmiş ve bir gece boyunca 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır (198, 200). İnkübasyon sonunda, besiyerleri Mega Star 1.6R (VWR International, LLC., A.B.D.) soğutmalı santrifüj kullanılarak 5000g’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelletler; PBS çözeltisi içerisinde uygun miktarlarda çözdürülerek kullanılmıştır.

3.2.2. Probiyotiklerin Nanofiber ile Enkapsülasyonu

Kullanılacak tüm çözeltiler, kimyasallar ve sarf malzemeler öncesinde sterilize edilmiş ve tüm işlemler steril koşullarda gerçekleştirilmiştir. Çözeltilerin hazırlanması ve elektroğirme işlemi Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Laboratuvarları'nda Canga ve Seker'in (2021) (184) yöntemi ile yapılmıştır.

Probiyotiklerin enkapsülasyonunda kullanılan fiberlerin üretimi için elektroğirme yöntemi kullanılmıştır. Elektroğirme yönteminde polimer olarak farklı birçok materyal kullanılmasına rağmen, çalışmada yüksek fiberleşme özelliğinden dolayı polivinil alkol (PVA) (MA 85000-124000, %99+ hidrolize) kullanılmıştır. Ayrıca PVA, genel olarak güvenilir ve zararsız olarak kabul edilen GRAS listesinde yer almaktadır. Üretilen ürünlerin öncelikli olarak insanların tüketimine sunulması amaçlandığı için özellikle GRAS listesinde yer alan bir polimer tercih edilmiştir.

Nanofiber yapıların üretilmesinde kullanılan PVA çözeltisinin hazırlanması; Canga ve Seker'in (2021) (184) geliştirdiği elektroğirme yöntemi modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Çözeltinin hazırlanmasında 1mM PBS (1 mM fosfat tamponu, 13.7 mM NaCl, (pH 7.4)) kullanılmıştır. Triton X-100 (Sigma-Aldrich Co., St Louis, A.B.D.) PVA çözeltisine belli oranlarda eklenmiştir. Elektroğirme işlemi başlatılmadan önce hazırlanan PVA çözeltisiyle, aynı oranda bakteri kültürü karıştırılmıştır.

Homojen bir yapı elde edildikten sonra PVA çözeltisi ve bakteri kültür karışımı, elektroğirme işleminde kullanılacak olan şırıngaya çekilmiştir. Elektroğirme işlemi için Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Laboratuvarı'nda bulunan tek nozullu elektroğirme cihazı kullanılmıştır. Elektroğirme işlemi; 1 mL/sa akış hızı ve 25 kV voltaj değerinde başlatılmıştır. Şırıngada bulunan çözelti, yüksek voltajın etkisiyle, sürekli dönen ve alüminyum folyo sarılı kolektörde, fiber yapıları oluşturarak toplanmıştır. Oluşan fiberlerin karakteristik özellikleri Bilkent Üniversitesi UNAM'da yapılmıştır.

3.2.3. Probiyotiklerin Mikroenkapsülasyonu

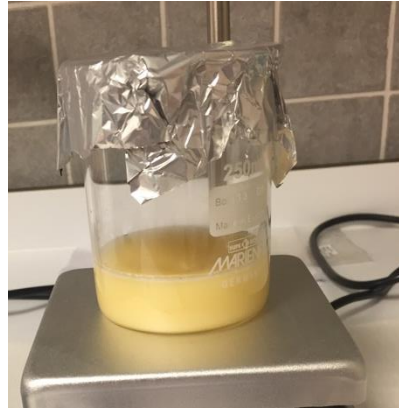
Çalışmanın bu kısmında probiyotiklerin emülsiyon yöntemiyle mikroenkapsülasyonu, Sultana ve ark. (2000) (201) ve Cakir ve Yilmaz (2021) (202) tarafından belirlenen protokol doğrultusunda geliştirilmiştir. Mikroenkapsülasyon işleminin ön uygulaması Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Mikroenkapsülasyon işlemi Hacettepe Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Kullanılan tüm çözeltiler, kimyasallar ve sarf malzemeler öncesinde sterilize edilmiş ve tüm işlemler steril koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Probiyotik bakterilerin mikroenkapsüle edilmesinde emülsiyon yöntemi kullanılmıştır. Emülsiyon yönteminde polimer olarak, sodyum aljinat ve selüloz asetat fitalat (Sigma-Aldrich Co., St Louis, A.B.D.) kullanılmıştır. Mikroenkapsülasyonda kaplama materyalinin toksik olmaması, ekonomik olması, stabilitelerinin yüksek ve geçirgenliğinin optimum olması gerekmektedir.

Mikroenkapsülasyon işlemi yapılmadan önce probiyotik bakteriler önceki bölümlerde belirtildiği şekilde bir gün öncesinde, hazırlanan stoklardan canlandırılmıştır. Canlandırılan bakteriler 5000g'de 5 dk boyunca santrifüj edilmiş ve elde edilen pelletler NaCl (Merck) çözeltisi ile iki kere yıkanmıştır. Ardından bakteri çözeltisi tekrar aynı koşullarda santrifüj edilip oluşan pelletler, NaCl çözeltisi ile süspansiyon edilmiştir. CAP ve alijnatın belirli oranlarda karıştırılarak önceden hazırlanmış polimer çözeltisi, bakteri kültürü ile karıştırılmış ve homojen yapının oluşması için 5 dk boyunca vortekslenmiştir.

Beher içerisine ticari olarak temin edilen mısırözü yağı (sürekli faz), bakteri çözeltisiyle 5:1 oranında olacak miktar belirlenerek eklenmiştir. Yağın içerisine Tween 80 (BioShop) steril koşullarda eklenmiş ve 10 dk boyunca karışması sağlanmıştır. Ardından polimer ve bakteri karışımı (süreksiz faz) beher içerisine eklenmiştir. Karışım, yağ içinde su emülsiyonunun oluşturulması amacıyla, manyetik karıştırıcı kullanılarak homojenize edilmiştir. Tamamen karışım gerçekleştiğinde, CaCl₂ (BioShop ve Merck) çözeltisi hızlıca eklenmiştir (Resim 3.1). Eklenen CaCl₂ ile, emülsiyon kırılarak kapsül yapıların sertleşmesi sağlanmıştır. Ağzı steril

alüminyum folyo ile kapatılan çözelti karışımı, buzdolabında (4°C) 2 saat boyunca kapsül yapıların dipte birikmesi için bekletilmiştir.



Resim 3.1. Polimer ve probiyotik bakterinin karışımı.

İki saatlik beklemenin sonunda; beherin üst kısmında yağ, orta kısımda CaCl_2 çözeltisi ve en dipte ise mikrokapsüller kalacak şekilde faz ayrımları gerçekleşmiştir. Üstte kalan yağ ve CaCl_2 çözeltisi steril koşullarda mümkün olduğu kadar uzaklaştırılmıştır. Ardından mikrokapsül haricindeki maddelerin tamamen ayrılması için üç kere yıkama işlemi yapılmıştır. İlkinde CaCl_2 çözeltisi, ikincisinde NaCl çözeltisi ve sonuncuda ise tekrar CaCl_2 çözeltisi ile yıkama işlemi yapılmıştır. 50 mL'lik steril falkonlarda gerçekleştirilen işlemde, yıkama çözeltileri 45 mL olacak şekilde falkonlara eklenmiş, yavaşça alt-üst edilerek kapsüllerin tekrar çökmesi beklenmiştir. Son yıkama sonrası elde edilen mikrokapsüller steril falkona aktarılarak doğrudan buzdolabı sıcaklığında depolanmıştır.

3.3. Enkapsüle Edilen Bakterilerin *in vitro* Koşullarda Canlılığının Değerlendirilmesi

Çalışmanın bu kısmı Hacettepe Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Farklı yöntemlerle enkapsüle edilen probiyotik bakterilerin *in vitro* koşullarda canlılık düzeyleri incelenmiş ve karşılaştırılmıştır. Simüle sindirim sisteminde kullanılacak çözeltilerin hazırlanmasında; Sahadeva ve ark. (2011) (203) ve Tokatlı ve ark. (2015) (204) tarafından yapılan çalışmalar temel alınarak, kullanılan probiyotik bakterilere göre bazı modifikasyonlar yapılmıştır. Farklı probiyotik bakteri türlerine göre simüle mide ve bağırsak çözeltileri hazırlanırken pH 1.5, 2, 2.5 ve 3'teki farklı pepsin

konsantrasyonları (0,3 mg/mL, 0,8 mg/mL ve 3 mg/mL) kullanılarak çoklu denemeler yapılmış ve canlılık düzeyleri belirlenmiştir. Denemeler sonucunda elde edilen sonuçlara göre simüle mide ve bağırsak çözeltilerinin parametreleri belirlenmiştir. Bu doğrultuda simüle mide çözeltisi ve simüle bağırsak çözeltilerinin hazırlanmasında farklı probiyotik bakterileri için kullanılan enzim ve pH değerleri Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Simüle mide çözeltisi ve simüle bağırsak çözelti bileşenleri.

	EcN	LGG
Simüle Mide Çözeltisi		
pH	2,5	3
Pepsin	0,8 mg/mL	0,8 mg/ mL
Simüle Bağırsak Çözeltisi		
pH	8	8
Pankreatin	1 mg/ mL	1 mg/ mL
Safra tuzu	0,4 mg/ mL	0,4 mg/ mL

Simüle mide çözeltisi hazırlanırken, 10 Mm PBS çözeltisi hazırlanmış ve pH değerleri tabloda verilen değerlere göre ayarlanmıştır. Ardından hazırlanan mide çözeltisi 121°C’de 15 dk sterilize edilmiştir. Sterilize edildikten sonra, pepsin belirtilen miktarlarda steril falkonlara eklenerek +4°C’de çalkalanarak tamamen çözünmesi sağlanmıştır.

Simüle bağırsak çözeltisi için ise; 10 Mmol PBS kullanılmıştır. Belirtilen oranlarda safra asidi eklenerek çözünmesi sağlanmış ve pH değeri 8’e ayarlanmıştır. Ardından çözelti, 121°C’de 15 dk sterilize edilmiştir. Sterilizasyonun ardından 1 mg/mL olacak şekilde pankreatin, çözeltiliye eklenerek +4°C’de tamamen çözünmesi için çalkalama işlemi uygulanmıştır.

Çözeltilerin hazırlanmasının ardından; serbest bakterilerin *in vitro* simülasyonu için, bir gece öncesinden taze olarak hazırlanan probiyotik bakterileri, 5000 g’de 5 dk santrifüj edilerek hücre pelletleri elde edilmiştir. Hücre pelletleri, 5 mL simüle mide çözeltisine aktararak 37°C’de 90 dk boyunca çalkalama işlemi yapılmıştır. Simüle mide çözeltisine aktarıldıktan hemen sonra, 45. dakikada ve 90. dakikada 100 µl numune alınarak seri dilüsyonlar yapılmıştır. Yüzeğe yayma

yöntemiyle bakterilerin canlılık düzeyleri, bakterilere uygun besiyerleri kullanılarak belirlenmiştir. Mide simülasyonu tamamlandıktan sonra, çözelti aynı oranda simüle bağırsak çözeltisi ile süspansiyon edilerek pH değeri 8'e ayarlanmıştır. Karışım, 37°C'de 90 dk boyunca hafif çalkalama işlemine devam edilmiştir. Bağırsak çözeltisine aktarıldıktan sonra, 45. dakikada ve 90. dakikada numune alınarak, benzer şekilde canlılık düzeyleri için steril koşullarda ekimler yapılmıştır.

Nanofiberle enkapsüle edilen bakterilerin sindirim simülasyonu için ise; üretilen fiberler steril koşullarda tartılarak, ağırlığının 100 katı olacak şekilde simüle mide çözeltisi ile süspansiyon edilmiştir. Çözeltiye 37°C'de 90 dk hafif çalkalama işlemi uygulanmıştır. Serbest hücrelere benzer şekilde başlangıçta, 45 ve 90. dakikalarda numuneler alınıp, yukarıda belirtildiği gibi uygun ekimler yapılmıştır. Bağırsak simülasyonu için, simüle mide çözeltisiyle karıştırılan simüle bağırsak çözeltisinin pH değeri 8'e ayarlanmıştır ve başlangıç, 45. dk ve 90. dakikalarda numuneler alınarak, canlılık düzeylerinin belirlenmesi için uygun ekimler yapılmıştır.

Mikroenkapsüle edilen probiyotik bakterilerin *in vitro* simülasyonu için ise; üretilen kapsüller simüle mide çözeltisine eklenmiştir. Çözelti, 37°C'de 90 dk boyunca çalkalanmıştır. Mide simülasyonu tamamlandıktan sonra, simüle bağırsak çözeltisi aynı oranlarda çözeltiye eklenmiş ve pH 8'e ayarlanmıştır. Aynı koşullarda çalkalama işlemine devam edilmiş ve başlangıç, 45. dk ve 90. dakikalarda numuneler alınıp ekimler yapılmıştır.

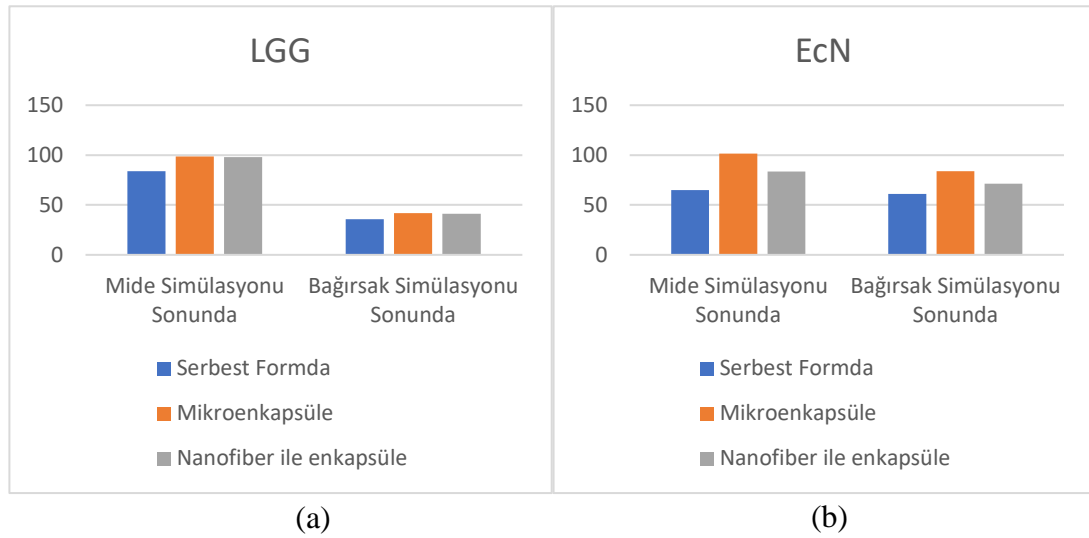
Sağkalım yüzdeleri belirlenirken, başlangıçta alınan numunelerin canlılık düzeyleri, mide ve bağırsak simülasyonu süresince farklı sürelerde alınan numunelerin canlılık düzeylerine oranlanarak hesaplanmıştır (Formül 3.1) (205):

$$\text{Sağkalım yüzdesi} = (\text{Koloni Sayısı } T_x / \text{Koloni Sayısı } T_0) \times 100 \quad (3.1.)$$

3.4. Enkapsüle Edilen Probiyotikleri Kısa Süreli Depolamanın Canlılık Düzeylerine Etkisi

Farklı yöntemlerle enkapsüle edilen probiyotik bakterilerin *in vitro* simülasyonu sonucunda elde edilen verilere göre; emülsiyon yöntemiyle

mikroenkapsüle edilen probiyotik bakterilerin farelere verilmesinin daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır (Grafik 3.2).



Grafik 3.2. Farklı formda bulunan LGG (a) ve EcN'nin (b) mide simülasyonu ve bağırsak simülasyonu sonunda canlılık düzeylerindeki azalma oranları (%).

Konuyla ilgili literatür taramalarına bakıldığında; farelere verilmek üzere üretilmesi planlanan mikroenkapsüle probiyotiklerin, kısa süreli depolama koşullarında canlılığını büyük ölçüde koruduğu görülmüştür. Fakat bu düzeyler, bakterilerin türüne ve depolama sıcaklığına göre farklılık gösterebilmektedir. Probiyotiklerin sağlık üzerinde istenen etkiyi gösterebilmeleri için belirli bir düzeyin üzerinde olması gerektiğinden, bu düzeyin korunduğu depolama süresinin belirlenmesi amacıyla +4°C'de, belirtilen yöntem ve materyaller kullanılarak üretilen bakterilerin bir hafta boyunca belirli aralıklarla (1, 3 ve 7. gün) canlılık düzeyleri analiz edilmiştir. Her numune iki paralel olacak şekilde analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar log, kob/ml olarak verilmiştir.

3.5. Enkapsüle Edilen Probiyotiklerin *in vivo* Koşullarda Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Çalışmanın *in vivo* kısmında, aynı soydan gelen 8 haftalık C57BL/6J türü 35 adet erkek fare Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim Merkezi'nden temin edilmiştir. Farelerin ağırlıkları; Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, 0.1 grama duyarlı hassas terazi ile tartılarak kaydedilmiştir. Tüm fareler her kafeste iki fare olacak şekilde transparan polikarbon kafeslere

yerleştirilmiştir. Burada 1 hafta boyunca; $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ortam sıcaklığı, 12 saat dönüşümlü aydınlık/karanlık ortam ve %45 nem koşullarında standardize edilmiştir. Standardizasyonun ardından çalışma süresince farelerin ağırlıkları ve yem tüketimleri; 0.1 grama duyarlı hassas terazi ile her gün tartılmıştır. Yem ve suyun *ad libitum* tüketimi sağlanmıştır. Çalışma; 1 hafta standardizasyon ve 6 hafta probiyotik müdahalesi olmak üzere toplam 7 hafta sürmüştür. Farelere probiyotik bakteriler oral gavaj ile her gün verilmiştir. Standardizasyon haftası sonrası, fareler rasgele 5 gruba ayrılmıştır.

3.5.1. Farelere Enkapsüle Probiyotik Müdahalesi

Farelerin tüketimi için, firmadan temin edilen standart yem kullanılmıştır (Arden Araştırma ve Deney, Ankara). Yemin enerji ve makrobesin ögesi içeriği Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Yemin makrobesin ögesi ve enerji içeriği.

Yem içeriği	Standart yem
Enerji (kkal/g)	2,6
Karbonhidrat (%enerji)	67,4
Protein (%enerji)	27,2
Yağ (%enerji)	5,4

1. Grup: Kontrol grubu (n=6), deney süresince standart yem ve suyun *ad libitum* tüketimi sağlanmıştır. Müdahale süresince 10.0 mL /kg-vücut ağırlığı olacak şekilde oral gavaj ile steril PBS verilmiştir (206).

2. Grup: Enkapsüle LGG deney grubu (n=8), deney süresince standart yem ve suyun *ad libitum* tüketimi sağlanmıştır. Emülsiyon yöntemi ile enkapsüle edilen probiyotik bakterileri (10^7 - 10^8 kob/mL /gün); farelere, 10.0 mL /kg-vücut ağırlığı olacak şekilde oral gavaj ile verilmiştir (206).

3. Grup: Serbest LGG deney grubu (n=6), deney süresince standart yem ve suyun *ad libitum* tüketimi sağlanmıştır. Önceden hazırlanan LGG stokları, MRS broth kullanılarak 37°C 'de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası LGG bakteri çözültüsü, 5000 g 'de 5 dk santrifüj edilerek hücre pelletleri, 1:1 oranında PBS ile

çözdürülmüştür. Müdahale boyunca her gün taze olarak hazırlanan probiyotik bakterileri farelere, 10.0 mL /kg-vücut ağırlığı olacak şekilde oral gavaj ile verilmiştir (206).

4. Grup: Enkapsüle EcN deney grubu (n=8), deney süresince standart yem ve suyun ad libitum tüketimi sağlanmıştır. Emülsiyon yöntemi ile enkapsüle edilen probiyotik bakterileri (10^7 - 10^8 kob/mL /gün); farelere, 10.0 mL /kg-vücut ağırlığı olacak şekilde oral gavaj ile verilmiştir (206).

5. Grup: Serbest EcN deney grubu (n=7), deney süresince standart yem ve suyun ad libitum tüketimi sağlanmıştır. Önceden hazırlanan EcN stokları, NB broth kullanılarak 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası EcN bakteri çözeltisi, 5000 g 'de 5 dk santrifüj edilerek hücre pelletleri, 1:1 oranında PBS ile çözdürülmüştür. Müdahale boyunca her gün taze olarak hazırlanan probiyotik bakterileri farelere, 10.0 mL /kg-vücut ağırlığı olacak şekilde oral gavaj ile verilmiştir (206).

Fare müdahalesine başlamadan önce, seçilen emülsiyon yöntemi kullanılarak enkapsüle edilen probiyotik bakterilerin başlangıçta ve depolama sonucu (1, 3 ve 7. gün, +4°C'de) canlılık düzeyleri değerlendirilmiştir. Farelere verilmek üzere, 6 gün boyunca verilecek olan miktarlar hesaplanmış, buna göre çoklu üretim yapılmıştır. Üretilen probiyotik bakterilerin, müdahale boyunca canlılık düzeylerine bakılmıştır. Üretilen kapsüllerin boyutlarının gavaj çapına (18 Gauge) uygun olmasına dikkat edilmiştir.

3.5.2. Anestezi, Kan Alma ve Ötanazi

Farelerde standardizasyon (1 hafta), diyet müdahalesi (6 hafta) ve ardından anestezi altında kan alma ve ötanazi işlemleri Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Yapılacak işlemlerden beş saat önce fareler aç ve susuz bırakılmıştır.

Anestezi

Fareler genel anestezi altına, terminal vücut ağırlıkları ölçüldükten sonra subkutan ketamin (Richter Pharma, Avusturya) ve ksilazin (Alfasan International

B.V., Hollanda) enjeksiyonu ile araştırmacılar tarafından alınmıştır. Anesteziye 150 mg/kg vücut ağırlığı ketamin ve 5 mg/kg vücut ağırlığı ksilazin kullanılmıştır.

Kan ve Doku Alma ve Ötenazi

Farelerin derin anesteziye girmeleri için gerekli sürenin ardından sabitlenerek vena kavadan kan alınmıştır. Ötenazi işlemi kan alındıktan sonra eksanguinasyon ile yapılmıştır. Kanlar sarı kapaklı tüplere alındıktan sonra yarım saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından 3000 g'de 15 dakika santrifüj (Heraeus Labofuge, Hanau, Germany) edilmiştir. Ayrılan serum örnekleri, santrifüjden hemen sonra steril ependorflara koyularak analiz edilene kadar -80°C'ye kaldırılmıştır. Ötenazi sonrası gastrointestinal sistem histopatolojik analiz için ayrılmıştır. Karaciğer dokusu ise diğer organlardan uygun şekilde disekte edilmiştir. Ardından karaciğer ikiye ayrılarak steril ependorflara koyulmuş ve doğrudan -80°C'ye kaldırılmıştır. Analiz edilene kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.5.3. Doku Analizleri

Çalışma için seçilen probiyotik türlerinin inflamasyon üzerindeki etkileri göz önüne alınarak, farelerden alınan serum örnekleri ve karaciğer dokuları uygun şekilde çözdürülerek ve anti- ve pro- inflamatuvar markerların (TNF- α , IL-6, IL-10, IFN γ ve IL-4) gen ekspresyon düzeyleri PCR ile analiz edilmiştir.

Sitokinlerin PCR ile Tayini

Çalışmanın sonunda farelerden alınan karaciğer dokularındaki TNF- α , IL-10, IL-6, IFN γ ve IL-4'ün gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi kullanılmıştır. Çalışma steril koşullarda yürütölmüştür.

1. Total RNA Ekstraksiyonu

Uygun şekilde çözdürölen karaciğer dokularından bistüri yardımıyla 80 mg doku steril ependorflara aktarılmıştır. Ardından 1 mL Nökleozol eklenmiş ve FP120 FASTPREP (Thermo,USA) homojenizatör cihazında 30 sn tamamen homojenize edilmiştir. 400 μ l ultra saf su eklenerek 15 sn vortekslenmiştir. Faz ayrımının

gerçekleşmesi için 15 dk oda sıcaklığında bekletilmiş ve sonrasında 12000 g'de 15 dk (+4°C'de) santrifüj edilmiştir. Elde edilen supernatanttan 1 mL çekilerek steril mikrosantrifüj tüplere aktarılmış ve içerisine 1 mL isopropanol eklenmiş ve karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 10 dk tekrar bekletildikten sonra aynı parametreler kullanılarak karışım tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası, supernatant kısmı dikkatlice uzaklaştırılmış ve altta kalan nükleik asit pelleti %75'lik etanol ile yıkamıştır. Yıkama işlemi iki kere tekrarlanmıştır ve her yıkama işlemi sonrasında etanol, santrifüj ile karışımdan uzaklaştırılmıştır. Santrifüj sonrası elde edilen RNA pelletleri 100 µl ultra saf su ile kullanılmak üzere çözündürülmüştür. cDNA sentezi öncesi ölçüm yapılan kadar -20 °C'de depolanmıştır.

2. Reverse Transkriptaz (cDNA) Sentezi

Uygun koşullarda (-20°C) saklanan RNA örnekleri, spektrofotometre cihazında 260/280 nm'de absorbans değerlerine bakılarak µl başına nükleik asitlerin miktar ve kirlilik düzeyleri kontrol edilmiştir. Elde edilen konsantrasyon düzeyleri baz alınarak RNA örnekleri cDNA sentezinde kullanılmak üzere SensiFAST cDNA Sentez Kiti (Meridian Bioscience, Australia) protokolüne göre toplam PCR karışımı hacminde 1 µg olacak şekilde optimize edilmiştir.

RT-PCR'da kullanılmak üzere, elde edilen RNA'lardan ilk aşama olarak cDNA sentezi SensiFAST cDNA Sentez Kiti içerisinde yer alan protokol doğrultusunda yapılmıştır. Tablo 3.3'te belirtilen miktarlardaki karışım, ayrı bir steril ependorfta olacak şekilde, buz üzerinde hazırlanmıştır.

Tablo 3.3. cDNA sentezinde kullanılan bileşenler ve miktarları.

Bileşenler	Miktar
Total RNA	Değişken
5 x TransAmp Buffer	4 µl
Reverse Transcriptase	1 µl
Ultra saf su	Total hacim 20 µl olacak miktarda

Belirlenen miktarlarda eklenen örneklerin üzerine 5 µl karışımdan eklenmiş ve toplam 20 µl'ye tamamlanan karışım hızlıca vortekslenmiştir. 1 µg RNA içerecek

şekilde PCR karışımı hazırlanmıştır. Protokolde belirtildiği şekilde aşağıda verilen sıcaklık değerlerine göre cDNA sentezi yapılmıştır.

- 25 °C 10 dk primer bağlaması
- 42 °C 15 dk reverse transkripsiyon işlemi
- 85 °C 5 dk enzim inaktivasyonu

Reaksiyon sonunda enzim, 85 °C’de 5 dk’da inaktive edilerek, cDNA ürünleri uygun koşullarda depolanmıştır.

3. RT-PCR mRNA Gen Ekspresyon Analizleri

Çalışma kapsamında analiz edilecek olan TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-6 ve IL-10 için spesifik genler için primerler HPLC yöntemiyle dizilenmiştir. Primerlerin oligonükleotid dizilimleri Tablo 3.4’te verilmiştir.

Tablo 3.4. Primerlerinin oligonükleotid dizilimleri.

Oligo Adı	5- Diziler -3
IFN- γ _F	CATCAGCAACAACATAAGC
IFN- γ _R	GACCTCAAACCTTGGCAATA
TNF- α _F	CCAAAGGGATGAGAAGTTC
TNF- α _R	GCTACAGGCTTGTCCT
ACTB_F	TGAAGATCAAGATCATTGCT
ACTB_R	GAAGGTGGACAGTGAGG
IL6_F	AAACTGGATATAATCAGGAAAT
IL6_R	CCTCTTGGTTGAAGATATG
IL10_F	CAGGACTTTAAGGGTACT
IL10_R	TTATTTTCACAGGGGAGAA
IL4_F	CACAGCAACGAAGAACAC
IL4_R	TGGACTIONTGGACTCATTCA

Liyofilize halde bulunan primerler, 0.5 M olacak şekilde ultra saf suyla çözdürülmüştür. Primerlerin çalıştığı sıcaklık değerlerinin optimum değerleri belirlenmiştir. Optimizasyon sonrası sitokinlerin optimum çalıştıkları sıcaklık değerleri Tablo 3.5’te gösterilmiştir.

Tablo 3.5. Sitokinlerin çalışıldığı optimum sıcaklık değerleri (°C).

Sitokinler	Sıcaklık değeri (°C)
IL-10	61
IL-6	55
TNF- α	61
IFN- γ	59
IL-4	62
ACT β	59

RT-PCR işleminde pozitif kontrol geni olarak Aktin β kullanılmıştır. Soğuk blok üzerinde Tablo 3.6'da verilen miktarlarda karışım hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler hızlıca vortekslenmiştir. Örnekler dublike olacak şekilde çalışılmıştır.

Tablo 3.6. RT-PCR'da kullanılan komponentler ve miktarları.

Komponentler	Miktar 1X
2x SensiFAST SYBR® No-ROX Mix	5 μ l
mRNA MixB (Primer)	2,5 μ l
mRNA cDNA	2,5 μ l

Hazırlanan örnekler; Tablo 3.6'da belirtilen termal döngüye uygun olarak RT-PCR cihazı ile çalışılmıştır. PCR'ın uygulama aşamasındaki okuma sıcaklıkları; her sitokin için Tablo 3.7'de verilen değerlerdir.

Tablo 3.7. PCR aşamaları.

PCR Aşaması	İşlem	Sıcaklık/Derece	Tekrar
İlk Denatürasyon	Denatürasyon	95°C-5 dk	1
	Denatürasyon	95°C-5 sn	
PCR Aplikasyon	Bağlanma	55-62°C* - 30 sn (Okuma)	40
Final	Soğutma	40 °C 30 sn	1

*Her sitokin için farklı sıcaklık değerleri kullanılmıştır.

Döngüler sonucunda elde edilen erime eğrileri ve Ct değerleri değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol geni temel alınarak $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ metodu (207) ile gen ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir.

3.5.4. Gastrointestinal Sistemin Histopatolojik Analizi

Fare Gastrointestinal Sisteminin Diseksiyonu ve Fare Taze Dokularının Toplanması

Aortası kesilerek ötenazi edilen farelerin ilk olarak gastrointestinal sistemi ayrılmıştır. Bu işlem için öncelikle rektum, çevre bağ dokudan cerrahi makas yardımıyla serbestleştirilmiştir. Daha sonra, özefagus distalinden yapılan kesi ile mide serbestleştirilerek tüm gastrointestinal sistem mideden rektuma kadar bozulmadan çıkarılmış ve soğuk 1X PBS içerisine alınmıştır.

Gastrointestinal sistemden taze doku toplanması için tüm sistem rektumdan mideye kadar cerrahi makas yardımıyla açılmıştır. Soğuk 1X PBS içerisinde gaitadan temizlendikten sonra fare kolon, ince bağırsak ve midesinden yaklaşık 0,2 cm x 1 cm boyutlarında ikişer örnek bistüri yardımıyla alınmıştır ve 1,5 mL ependorf tüplere yerleştirilmiştir. Örnekler -80°C’de saklanmıştır.

Fare Gastrointestinal Sisteminin Histopatolojik İncelenmesi

Diseksiyon işlemi sırasında çıkarılan ve cerrahi makasla açılan gastrointestinal sistem %10 tamponlu formaldehit solüsyonu (TK.060161, Tekkim) içerisine alınarak fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrasında distal kolon, proksimal kolon, ileum, jejunum, duodenum ve mideden bistüri yardımıyla doku parçaları alınarak gastrointestinal sistem 6 farklı noktadan örneklenmiştir. Alınan parçalar kasetlenerek rutin histopatoloji işlemlerinden geçirilmiştir ve ardından tek bir doku bloğunda 6 doku parçası yer alacak şekilde bloklanmıştır. Hazırlanan doku bloklarından 3,5 µm kalınlığında doku kesitleri alınarak hematoksilin ve eozin (H&E) ile boyanmıştır (208). Boyanan doku kesitleri ışık mikroskobu altında Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Patoloji ABD Laboratuvarı’nda incelenmiştir.

3.6. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

İstatistiksel analizler, SPSS (Statistical Package for Social Science, Inc., Chicago, IL, ABD) versiyon 23.0 yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Tanımlayıcı

analizler ortalama \pm standart sapma değerleri ve normal dağılmayan değişkenler için ortanca değerler kullanılarak verilmiştir.

Serbest formda bulunan ve farklı yöntemlerle enkapsüle edilen probiyotiklerin sindirim simülasyonu süresince zamanla değişimin, depolama süresince üretilen probiyotiklerin canlılığındaki değişimin, farelerin vücut ağırlığı, yem tüketim miktarları, enerji ve makrobesin öğeleri alımlarının zamanla değişimin istatistiksel anlamlılığı Friedman testi kullanılarak incelenmiştir. Gereği halinde ikişerli karşılaştırmalar Wilcoxon testi kullanılarak yapılmıştır ve Bonferroni düzeltmesi kullanılarak değerlendirilmiştir.

Simüle mide ve bağırsak çözeltileri sonunda enkapsülasyon yöntemleri arasındaki farklar ve farelerin proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinlerin gen ekspresyon düzeyi değişkenleri gruplar arasında Kruskal-Wallis testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. İkişerli karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi kullanılarak yapılmıştır.

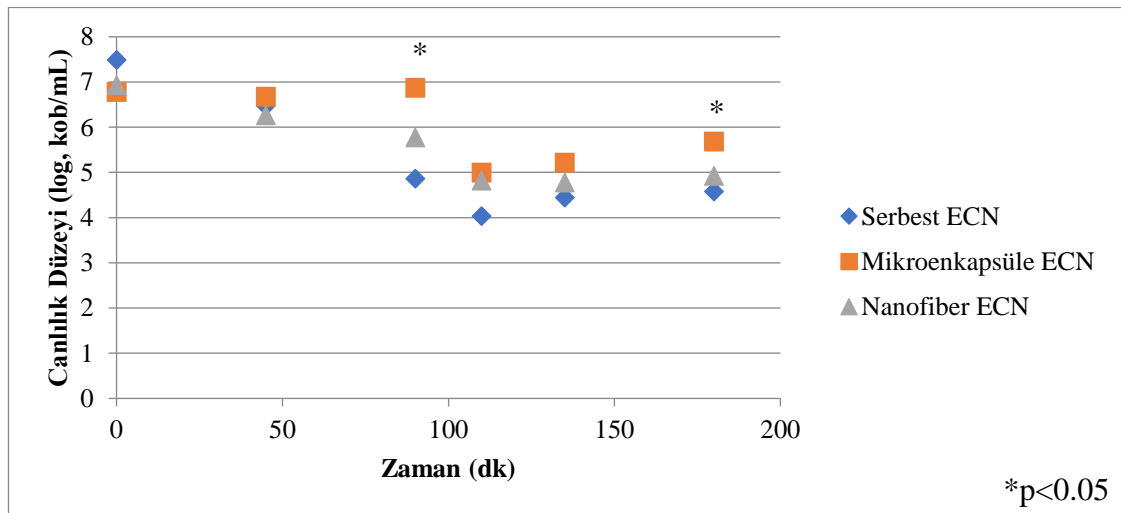
En az biri normal dağılmayan değişkenler arası ilişkiler için korelasyon katsayıları ve istatistiksel anlamlılıkları Spearman testi ile hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık için toplam tip 1 hata düzeyi %5 olarak kullanılmıştır (209).

4. BULGULAR

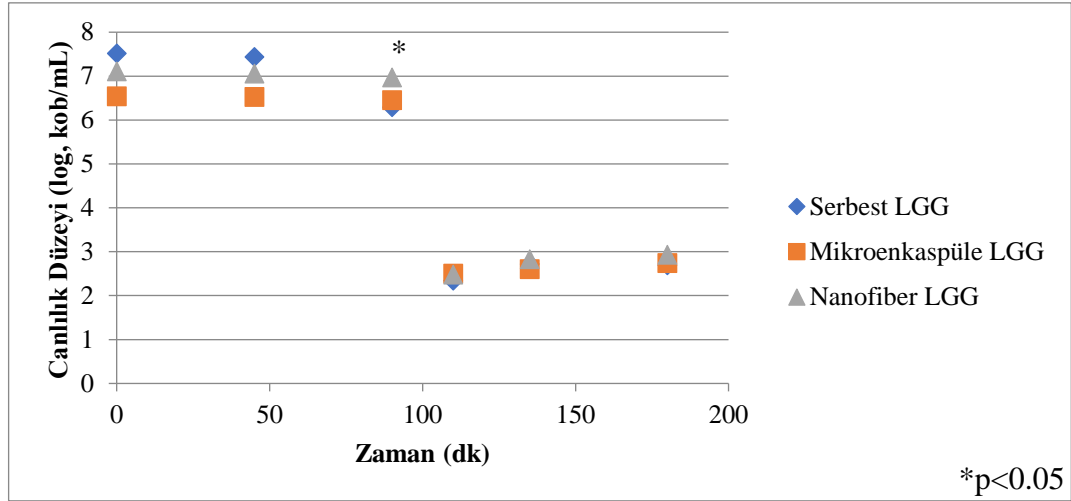
Probiyotiklerin farklı yöntemlerle enkapsüle edilmesi, enkapsüle bakterilerin *in vitro* koşullarda canlılığının değerlendirilmesi ve *in vivo* koşullarda inflamatuvar göstergelerin gen ekspresyon düzeylerinin analiz edilmesi olmak üzere üç temel kısımdan oluşan çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

4.1. Farklı Yöntemlerle Enkapsüle Edilen Probiyotik Bakterilerin *in vitro* Koşullarda Canlılığının Değerlendirilmesi

Serbest halde bulunan, nanofiberle enkapsüle edilen ve mikroenkapsüle edilen probiyotiklerin (LGG ve EcN) simüle mide ve bağırsak çözeltilisindeki canlılık düzeyleri; sindirim simülasyonu boyunca 45 dakikalık aralıklarla analiz edilmiştir. Farklı bakterilerden elde edilen sonuçlar Grafik 4.1a ve Grafik 4.1 b’de gösterilmiştir. EcN probiyotik bakterileri için simüle mide koşullarındaki canlılık düzeylerinde azalmanın serbest formda olan bakterilerde daha fazla olduğu görülürken, LGG probiyotik bakterilerinin mide koşullarındaki canlılıklarının benzer olduğu görülmüştür. Her iki bakteri türü için de simüle bağırsak koşullarında hızlı bir azalmanın olduğu saptanmıştır. Bu azalmanın LGG probiyotik bakterilerde daha fazla olduğu görülmektedir.



(a)



(b)

Grafik 4.1. Serbest halde bulunan, mikroenkapsüle edilen ve nanofiberle enkapsüle edilen EcN (a) ve LGG (b) probiyotik bakterilerinin sindirim sistemi simülasyonundaki canlılık düzeyleri (log, kob/mL).

Farklı yöntemlerle enkapsüle edilen probiyotik bakterilerin başlangıçta, mide sonunda ve bağırsak sonundaki canlılık düzeyleri Tablo 4.1’de gösterilmiştir. LGG’nin başlangıçta $7,51 \pm 0,04$ log kob/mL olan canlılık düzeyinin bağırsak sonunda $2,69 \pm 0,15$ log kob/mL’ye düştüğü görülmüştür. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Benzer şekilde *in vitro* koşullarda, mikroenkapsüle edilen EcN ve LGG probiyotik bakterilerinin de başlangıç, mide sonu ve bağırsak sonundaki canlılık düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). Nanofiber ile enkapsüle edilen LGG’nin başlangıçta $7,11 \pm 0,10$ log, kob/mL olan canlılık düzeyinin, mide sonunda $6,97 \pm 0,10$ log kob/mL’ye, bağırsak sonunda ise $2,93 \pm 0,46$ log kob/mL’ye kadar düştüğü görülmüştür. EcN için ise; başlangıçta $6,92 \pm 0,11$ log kob/mL olan canlılık düzeyi simüle mide çözeltisi sonrası $5,78 \pm 0,22$ log kob/mL’ye, simüle bağırsak çözeltisi sonrasında ise $4,93 \pm 0,04$ log kob/mL’ye düşmüştür. Nanofiberle enkapsüle edilen her iki bakteri türü için de simüle sindirim sistemindeki canlılık düzeylerindeki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Tablo 4.1. Mikroenkapsülasyon ve nanofiber ile enkapsüle edilen LGG ve EcN probiyotik bakterilerin *in vitro* koşullarda canlılık düzeyleri (log, kob/mL).

Besiyerine ekim yapılan probiyotik formları**	Sindirim Simülasyon Aşamaları			p *
	Başlangıç	Mide Sonu	Bağırsak sonu	
LGG (log, kob/mL)				
Serbest Formda (n=4)	7,51 ± 0,04	6,29 ± 0,21	2,69 ± 0,15	0,018
Mikroenkapsüle (n=4)	6,53 ± 0,18	6,45 ± 0,16	2,74 ± 0,14	0,039
Nanofiber ile enkapsüle (n=2)	7,11 ± 0,10	6,97 ± 0,10	2,93 ± 0,46	0,156
EcN (log, kob/mL)				
Serbest Formda (n=4)	7,49 ± 0,24	4,86 ± 0,15	4,58 ± 0,19	0,018
Mikroenkapsüle (n=4)	6,78 ± 0,17	6,87 ± 0,20	5,68 ± 0,08	0,050
Nanofiber ile enkapsüle (n=2)	6,92 ± 0,11	5,78 ± 0,22	4,93 ± 0,04	0,135

*Non-parametrik, Friedman testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık p<0,05 olarak verilmiştir.

**EcN için NB, LGG için MRS kullanılmıştır. LGG, *Lactobacillus rhamnosus*; EcN, *Escherichia coli Nissle 1917*.

Her iki bakteri için; başlangıca kıyasla mide simülasyonu ve bağırsak simülasyonu sonundaki canlılık düzeylerindeki azalma yüzdeleri Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Buna göre LGG probiyotik bakterileri için; mide simülasyonu sonunda en fazla azalmanın serbest halde bulunan bakterilerde (%83,74 ± 2,89) olduğu gösterilmiştir. Mikroenkapsüle ve nanofiberle enkapsüle edilen bakterilerin canlılığında ise benzer oranlarda (sırasıyla; %98,69 ± 1,64, % 98,1 ± 2,69) azalma olduğu görülmüştür. Gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (p<0,05). Bu farklılığın ise serbest formda bulunan bakteriler ile mikroenkapsüle edilen bakteriler arasında olduğu saptanmıştır (p=0.043) (Tablo 4.2). EcN probiyotik bakterilerinin canlılığında ise en fazla azalmanın serbest halde bulunan bakterilerde olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir (p<0,05) (Tablo 4.2). Aradaki bu fark serbest formda bulunan ve mikroenkapsüle edilen bakterilerden kaynaklandığı bulunmuştur (p=0.015).

Bağırsak simülasyonu sonunda başlangıca kıyasla serbest halde bulunan LGG probiyotik bakterilerin canlılığında ciddi bir azalma (%35,80 ± 1,87) olduğu bulunmuş fakat gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0,05) (Tablo 4.2). Mikroenkapsülasyon ve nanofiberle enkapsülasyon işlemleri sonucunda elde edilen canlılık düzeyleri ise benzerdir (sırasıyla; %41,94 ± 1,24, %41,24 ± 7,05). EcN’in bağırsak koşullarında canlılığını daha iyi koruduğu görülmüştür. EcN probiyotik bakterilerinin canlılığını, mikroenkapsülasyon yönteminin daha yüksek

oranlarda koruduğu saptanmıştır (%83,89 ± 1,31). Serbest halde bulunan EcN'nin, simüle bağırsak koşullarında canlılığını daha az koruduğu (%61,13±0,57), nanofiberle enkapsülasyon yönteminin mikroenkapsülasyon yönteminden daha az koruduğu gösterilmiştir (Tablo 4.2). Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ve bu farkın serbest ve mikroenkapsüle EcN'dan kaynaklandığı bulunmuştur (p<0,05).

Tablo 4.2. Mikroenkapsülasyon ve nanofiber ile enkapsüle edilen LGG ve EcN probiyotik bakterilerin *in vitro* koşullarda canlılık düzeylerindeki yüzde değişim.

Bakteri Türleri	<i>In vitro</i> canlılık sonuçları (%)	
	Mide Simülasyonu Sonunda	Bağırsak Simülasyonu Sonunda
LGG		
Serbest Formda (n=4)	83,74 ± 2,89 ^a	35,80 ± 1,87
Mikroenkapsüle (n=4)	98,69 ± 1,64 ^b	41,94 ± 1,24
Nanofiber ile enkapsüle (n=2)	98,1 ± 2,69	41,24 ± 7,05
p *	0,036	0,063
EcN		
Serbest Formda (n=4)	64,92 ± 0,75 ^a	61,13 ± 0,57 ^a
Mikroenkapsüle (n=4)	101,43 ± 4,37 ^b	83,89 ± 1,31 ^b
Nanofiber ile enkapsüle (n=2)	83,46 ± 1,86	71,21 ± 1,65
p *	0,02	0,02

* Non-parametrik, Kruskal-Wallis testi uygulanmıştır. ^{ab}Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler birbirinden farklıdır (Wilcoxon test). İstatistiksel anlamlılık p<0,05 olarak verilmiştir. LGG, *Lactobacillus rhamnosus*; EcN, *Escherichia coli* Nissle 1917.

4.2. Depolamanın Canlılık Üzerine Etkisi

In vitro deney sonrası mikroenkapsülasyon yönteminin canlılık düzeyini nanofiberle enkapsülasyon yöntemine göre daha fazla koruduğu bulunduğu için, depolama (+4°C) koşullarında mikroenkapsüle ve serbest formda bulunan bakterilerin canlılık düzeylerindeki değişiklikler analiz edilmiş ve sonuçlar Tablo 4.3'te gösterilmiştir. Çalışmanın *in vivo* kısmında kullanılması planlanan bakterilerin en fazla bir hafta süreyle saklanması planlandığı için gün aşırı olacak şekilde canlılık düzeyleri analiz edilmiştir. Serbest ya da mikroenkapsüle edilmesinden bağımsız olarak her iki bakteri için de +4°C'de bir hafta boyunca depolamanın, canlılık düzeylerinde azalmaya neden olmadığı görülmüştür (p>0.05). Aynı zamanda serbest ve mikroenkapsüle formda olan bakterilerin aynı günlerdeki canlılık düzeylerinin de benzer olduğu saptanmıştır (Tablo 4.3). Bu durum da farelere verilmesi planlanan

probiyotiklerin dozları arasındaki farklılıktan kaynaklanabilecek yorum hatalarının elimine edildiğini kanıtlar niteliktedir.

Tablo 4.3. Mikroenkapsülasyon ile enkapsüle edilen LGG ve EcN probiyotik bakterilerin depolama (+4°C) boyunca canlılık düzeyleri.

Depolama Süresi	Probiyotik Türü					
	LGG (log, kob/mL)			EcN (log, kob/mL)		
	Serbest Formda n=2	Mikroenkapsüle n=2	p **	Serbest Formda n=2	Mikroenkapsüle n=2	p **
1. gün	9,17 ± 0,56	8,99 ± 0,52	0,333	9,63 ± 0,09	8,60 ± 0,49	0,333
3. gün	8,29 ± 0,35	7,54 ± 0,34	0,333	9,34 ± 0,47	8,21 ± 0,18	0,333
7. gün	9,26 ± 0,21	7,48 ± 0,67	0,333	9,36 ± 0,25	8,73 ± 0,35	0,333
p *	0,223	0,223		0,223	0,607	

*Non-parametrik, Friedman testi uygulanmıştır. ** Non-parametrik, Mann-Whitney U testi testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak verilmiştir. LGG, *Lactobacillus rhamnosus*; EcN, *Escherichia coli Nissle 1917*.

4.3. Farklı Yöntemlerle Enkapsüle Edilen Probiyotik Bakterilerin *in vivo* Koşullarda Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Çalışmanın *in vitro* kısmında; farklı yöntemlerle enkapsüle edilen probiyotik bakterilerin canlılığını en iyi mikroenkapsülasyon yönteminin koruduğu görülmüştür. Bu nedenle, mikroenkapsüle edilen probiyotik bakteriler kullanılarak, çalışmanın *in vivo* kısmı yürütülmüştür.

4.3.1. Deney Hayvanlarının Vücut Ağırlığı Değişimlerinin Değerlendirilmesi

Çalışmaya dahil edilen farelerin vücut ağırlıklarının ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 4.4'te verilmiştir. Tabloda standardizasyon başlangıcı, standardizasyon dönemi sonu ve 6 haftalık probiyotik müdahale dönemi boyunca haftalık ortalama vücut ağırlığındaki değişimler gösterilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen 8 haftalık farelerin vücut ağırlıkları, 20g – 22.3g arasında değişmektedir ve standardizasyon döneminin başlangıcında ve sonunda ortalama vücut ağırlıkları açısından gruplar arasında anlamlı bir fark yoktur ($p > 0.05$) (Tablo 4.4). LGG verilen gruplara bakıldığında müdahale dönemi boyunca; kontrol, serbest halde bulunan LGG ve mikroenkapsüle LGG verilen grupların ortalama vücut

ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). EcN verilen gruplar için de benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Her bir grubun müdahale başlangıcına göre, haftalık vücut ağırlıklarındaki değişimlerine bakıldığında; kontrol ($p=0.11$) ve serbest LGG ($p=0.52$) verilen gruplar hariç diğer gruplarda, istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur. Aradaki farkın; mikroenkapsüle LGG verilen grupta birinci – üçüncü ($p<0.01$), birinci – dördüncü ($p<0.01$), birinci – beşinci ($p<0.01$) ve birinci - altıncı ($p<0.01$) haftalardan; serbest EcN verilen grupta birinci ve altıncı haftalardan ($p<0.01$) ve mikroenkapsüle EcN verilen grupta ise birinci ve beşinci ($p=0.03$) ve birinci-altıncı ($p=0.03$) haftalardan kaynaklandığı görülmüştür (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Farklı deney gruplarında deney süresince vücut ağırlığı değişimleri.

Müdahale Dönemi	Vücut ağırlığı (g/gün) (ort ± ss)			p*
	LGG			
	Kontrol grubu n=6	Serbest Form n=6	Mikroenkapsüle n=8	
Standardizasyon öncesi	21,48 ± 3,53	21,78 ± 2,18	20,00±1,30	0,318
Standardizasyon sonu	21,37 ± 4,71	21,92 ± 3,02	19,81±1,63	0,393
1. hafta	21,05 ± 4,34	21,78 ± 2,78	19,18±1,43^a	0,175
2. hafta	21,04 ± 2,99	21,62 ± 2,32	19,29±1,65	0,189
3. hafta	21,62 ± 2,56	21,57 ± 2,04	19,67±1,25^b	0,119
4. hafta	21,70 ± 2,71	21,39 ± 2,01	19,76±1,56^b	0,167
5. hafta	21,94 ± 2,83	21,39 ± 2,79	20,08±1,45^b	0,269
6. hafta	22,65 ± 2,67	22,23 ± 3,47	20,31±1,69^b	0,190
p**	0.122	0.526	0.001	
Müdahale Dönemi	EcN			p*
	Kontrol grubu n=6	Serbest Form n=7	Mikroenkapsüle n=8	
	Standardizasyon öncesi	21,48 ± 3,53	22,33±1,59	
Standardizasyon sonu	21,37 ± 4,71	21,96±1,93	20,51±1,19	0,328
1. hafta	21,05 ± 4,34	21,02±2,29^a	19,90±,94^a	0,556
2. hafta	21,04 ± 2,99	20,86±1,93	19,86±,58	0,523
3. hafta	21,62 ± 2,56	21,06±1,78	19,76±,65	0,194
4. hafta	21,70 ± 2,71	21,30±1,82	20,39±,79	0,570
5. hafta	21,94 ± 2,83	21,77±1,99	20,60±,75^b	0,536
6. hafta	22,65 ± 2,67	22,26±1,91^b	20,76±,74^b	0,219
p**	0.122	0.001	0.003	

*Non-parametrik, Kruskall Wallis testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak verilmiştir. ** Non-parametrik, Friedman testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak verilmiştir. ^{ab}Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler birbirinden farklıdır (Wilcoxon test). LGG, *Lactobacillus rhamnosus*; EcN, *Escherichia coli Nissle 1917*.

Kontrol grubundaki farelerin 6 haftalık müdahale dönemi boyunca ortalama vücut ağırlığında, müdahale öncesi dönemdeki vücut ağırlığına göre artış olduğu bulunmuştur (Sırasıyla 21,67±2,99g ve 21,43±4,06g) ($p=0.60$) (Tablo 4.5). Serbest formda ve mikroenkapsüle formdaki LGG verilen grupların vücut ağırlığında ise hafif bir azalma olduğu görülmüştür (sırasıyla serbest form için 21,85±2,46g ve 21,67±2,49g ($p=0.753$); mikroenkapsüle için 19,90±1,44g ve 19,72±1,47g ($p=0.484$)). EcN için de benzer sonuçlar elde edilmiştir (sırasıyla serbest form için 22,14±1,72g ve 21,38±1,91g ($p=0.603$); mikroenkapsüle için 20,73±1,13g ve 20,21±,61g

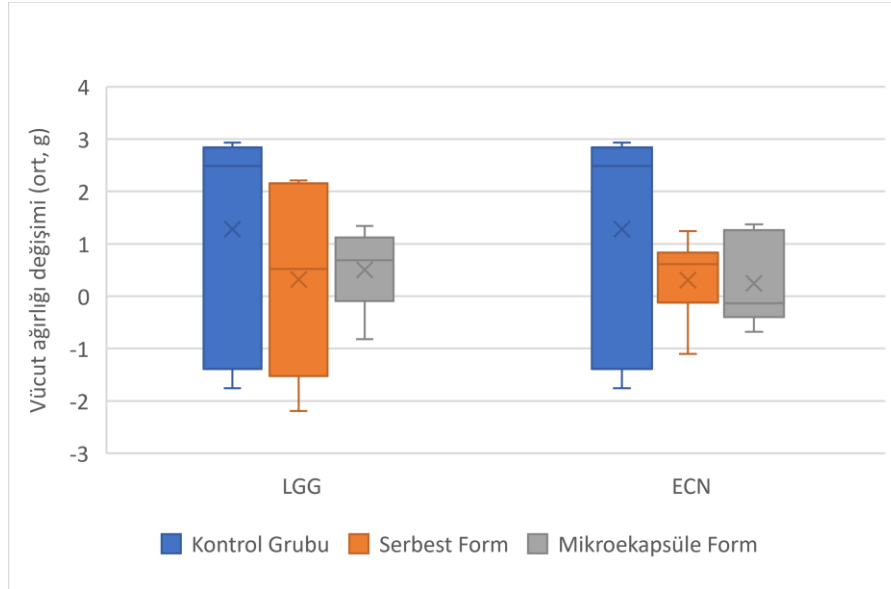
($p=0.093$). Müdahale öncesi ve dönemi boyunca ortalama vücut ağırlıkları açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 4.5. Farelerin müdahale öncesi ve sonrası dönemde farklı probiyotik gruplarına göre vücut ağırlıklarındaki değişim.

Müdahale Dönemi	Vücut ağırlığı (g/gün) (ort ± ss)			p *
	LGG			
	Kontrol n=6	Serbest Form n=6	Mikroenkapsüle n=8	
Müdahale öncesi	21,43±4,06	21,85±2,46	19,90±1,44	0,366
Müdahale Dönemi	21,67±2,99	21,67±2,49	19,72±1,47	0,152
p **	0,600	0,753	0,484	
Müdahale Dönemi	EcN			p *
	Kontrol n=6	Serbest Form n=7	Mikroenkapsüle n=8	
	Kontrol n=6	Serbest Form n=7	Mikroenkapsüle n=8	
Müdahale öncesi	21,43±4,06	22,14±1,72	20,73±1,13	0,328
Müdahale Dönemi	21,67±2,99	21,38±1,91	20,21±,61	0,457
p **	0,600	0,063	0,093	

*Non-parametrik, Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p<0,05$ olarak verilmiştir.
** Non-parametrik, Wilcoxon testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p<0,05$ olarak verilmiştir.
LGG, *Lactobacillus rhamnosus*; EcN, *Escherichia coli Nissle 1917*.

Altı haftalık probiyotik müdahalesinin sonundaki ortalama vücut ağırlığı ile probiyotik müdahalesinin başındaki ortalama vücut ağırlıklarındaki değişim Grafik 4.2’de verilmiştir. Her iki probiyotik bakteri verilen gruplara kıyasla, ortalama vücut ağırlığındaki artış, kontrol grubunda daha yüksektir. Serbest halde bulunan LGG verilen farelerin müdahale sonundaki ortalama vücut ağırlıklarındaki artış, enkapsüle LGG verilen gruptaki farelerle benzer düzeydedir. EcN verilen farelerde ise, enkapsüle EcN verilen gruptaki ortalama vücut ağırlığındaki artış, serbest EcN verilen gruptakilere göre daha az bulunmuştur. Fakat probiyotik türünden bağımsız olarak, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).



Grafik 4.2. Farklı probiyotik (LGG ve EcN) müdahalesi süresince ortalama vücut ağırlıklarındaki değişim düzeyleri (g).

4.3.2. Deney Hayvanlarının Yem Tüketimi

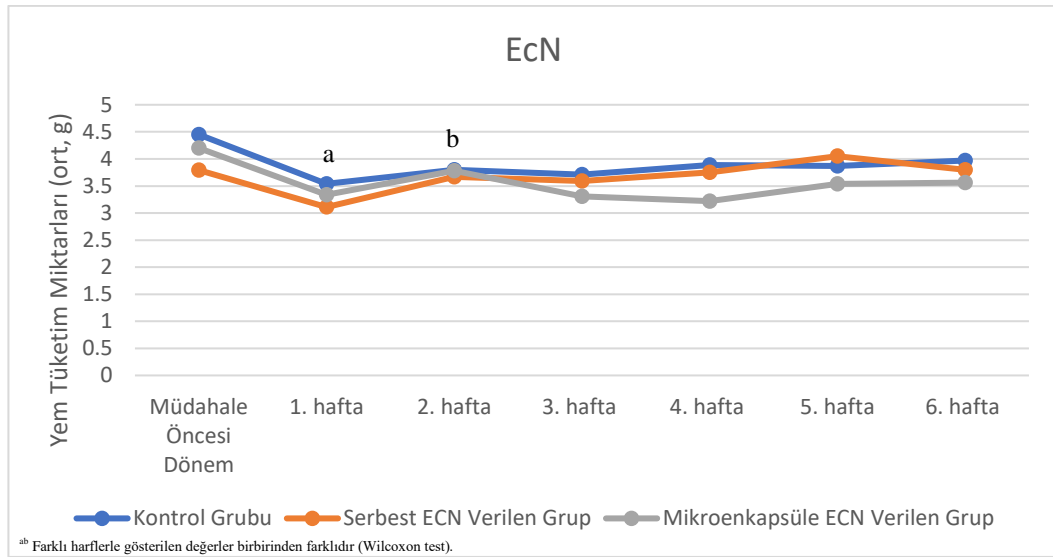
Yapılan çalışmada farelerin müdahale öncesi ve müdahale dönemi boyunca tükettikleri yem tüketim değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 4.6'da verilmiştir. Müdahale öncesi dönemde yem tüketimleri açısından gruplar arasında bir fark olmadığı görülmüştür (LGG, $p=0.85$; EcN, $p=0.11$). Benzer şekilde müdahale döneminde de tüketilen yem miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (LGG, $p=0.41$; EcN, $p=0.17$). Tüm gruplarda müdahale öncesi dönemde yem tüketimlerinin müdahale dönemindeki yem tüketimlerine göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Kontrol grubunda müdahale öncesi döneme ($4,45 \pm 1,16$ g) göre müdahale döneminde ($3,80 \pm 0,47$ g) yem tüketimlerinde artış olduğu görülmüş fakat aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.11$). Serbest formda LGG ve mikroenkapsüle LGG verilen gruplarda da benzer şekilde müdahale döneminde bir azalma olduğu görülmüş fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). Mikroenkapsüle EcN verilen grupta müdahale öncesi döneme kıyasla müdahale döneminde yem tüketimlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu ($p=0.01$), buna karşın serbest formda EcN verilen grubun ortalama yem tüketimlerindeki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p=0.23$).

Tablo 4.6. Müdahale öncesinde ve müdahale dönemi boyunca farelerin ortalama yem tüketim miktarları (g/gün).

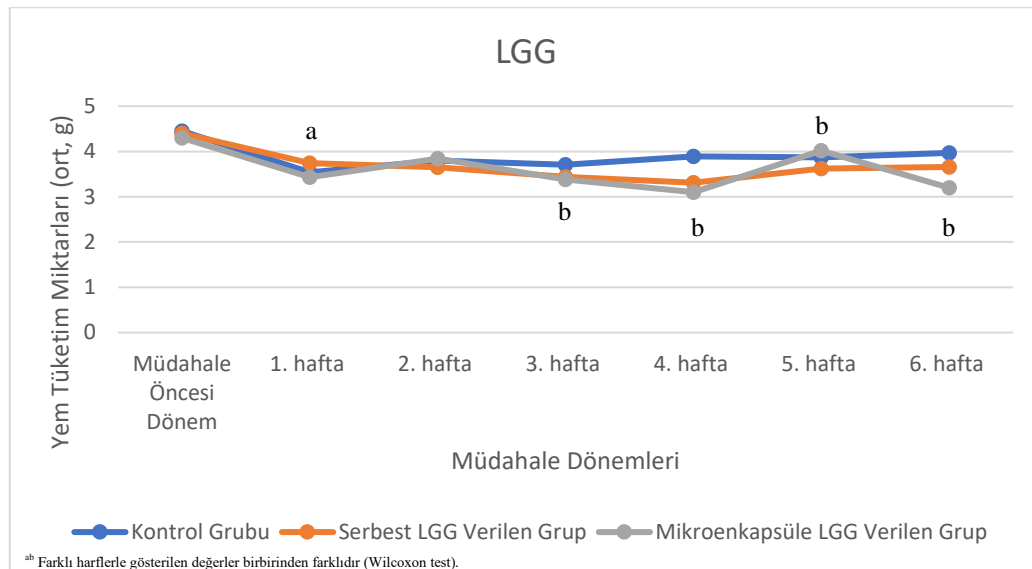
Müdahale Dönemi	Yem tüketim düzeyleri (g/gün) (ort ± ss)			p *
	LGG			
	Kontrol n=6	Serbest Form n=6	Mikroenkapsüle n=8	
Müdahale öncesi	4,45±1,16	4,40±1,16	4,30±0,25	0,846
Müdahale Dönemi	3,80±,47	3,57±,44	3,49±,22	0,412
p **	0,114	0,027	0,011	
Müdahale Dönemi	EcN			p *
	Kontrol n=6	Serbest Form n=7	Mikroenkapsüle n=8	
	Müdahale öncesi	4,45±1,16	3,79±0,76	
Müdahale Dönemi	3,80±,47	3,66±,32	3,46±,08	0,174
p **	0,114	0,235	0,011	

*Non-parametrik, Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak verilmiştir.
 **Non-parametrik, Wilcoxon testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak verilmiştir.
 LGG, *Lactobacillus rhamnosus*; EcN, *Escherichia coli Nissle 1917*.

Müdahale öncesi ve dönemi boyunca farelerin haftalık olarak tükettiği ortalama yem tüketim miktarları Grafik 4.3'te verilmiştir. Müdahale öncesi dönemdeki yem tüketim miktarları, müdahalenin başladığı ilk haftada azalmış sonrasındaki haftalarda ise artmaya başlamıştır. Müdahale dönemi boyunca farelerin haftalık ortalama yem tüketim miktarları arasında kontrol ($p=0.14$), serbest LGG ($p=0.08$) ve serbest EcN ($p=0.10$) verilen gruplarda fark bulunmamıştır. Mikroenkapsüle verilen grupların haftalık ortalama yem tüketimleri arasında ise istatistiksel olarak fark bulunmuştur (LGG ve EcN, $p < 0.01$). Bu gruplar arasındaki farkın; mikroenkapsüle EcN verilen grupta birinci-ikinci haftalardan; mikroenkapsüle LGG verilen grupta ise birinci-üçüncü, birinci-dördüncü, birinci-beşinci ve birinci-altıncı haftalardan kaynaklandığı gösterilmiştir (Grafik 4.3a ve Grafik 4.3b).



(a)



(b)

Grafik 4.3. Müdahale süresince farklı formda EcN (a) ve LGG (b) verilen grupların haftalık yem tüketim miktarları (g/gün).

4.3.4. Deney Hayvanlarının Enerji ve Makrobesin Ögesi Alım Düzeyleri

Müdahale öncesi ve müdahale dönemi boyunca farelerin farklı bakteri türlerine göre enerji ve makrobesin ögesi alım düzeyleri Tablo 4.7’de verilmiştir. Yem tüketimleriyle paralel olarak müdahale öncesi dönemde enerji ve besin ögesi alım düzeylerinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Hem müdahale öncesi hem de müdahale dönemi için; LGG verilen grupta enerji ve makrobesin ögesi alım düzeylerinin, kontrol grubunda en yüksek, sonrasında ise sırasıyla serbest LGG ve

mikroenkapsüle LGG verilen gruplarda olduğu görülmüştür ($p>0.05$). EcN verilen gruplara bakıldığında ise müdahale öncesi dönemde en yüksek enerji ve makrobesin ögesi alan grupların sırasıyla; kontrol, mikroenkapsüle EcN ve serbest EcN olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Müdahale döneminde ise bu sıralama; kontrol, serbest formda EcN ve mikroenkapsüle EcN'dir ($p>0.05$).

Müdahale öncesi ve müdahale döneminde; enerji ve makrobesin ögesi dağılımları Grafik 4.4'te gösterilmiştir. Buna göre enerji düzeyleri açısından aradaki fark kontrol grubu hariç diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Serbest LGG $p=0.027$; Mikroenkapsüle LGG $p=0.01$) (Grafik 4.4). Makrobesin ögelerinin müdahale öncesi ve dönemindeki düzeylerine bakıldığında ise; kontrol ve serbest LGG verilen gruplarda tüm makrobesin ögeleri düzeylerine göre farklılık olmadığı bulunmuşken, mikroenkapsüle LGG verilen grupta tüm makrobesin ögesi alım düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gösterilmiştir (Grafik 4.4).

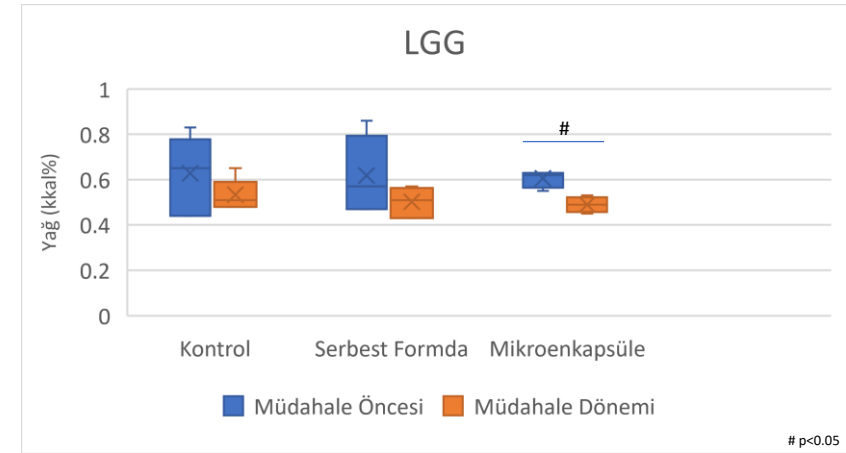
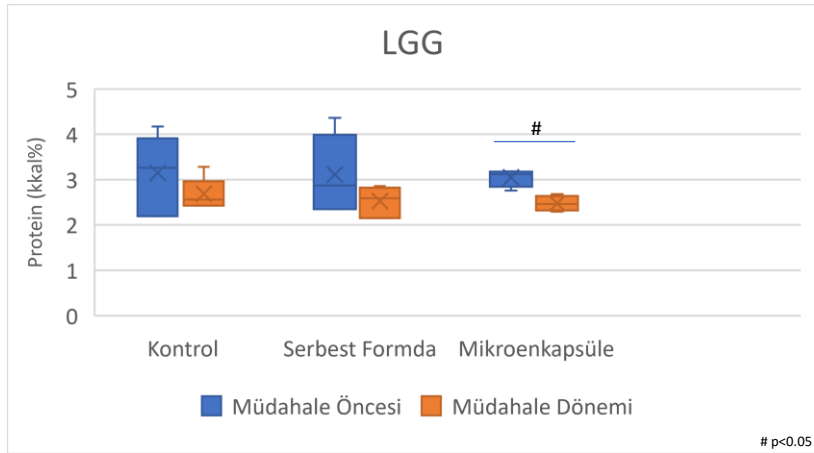
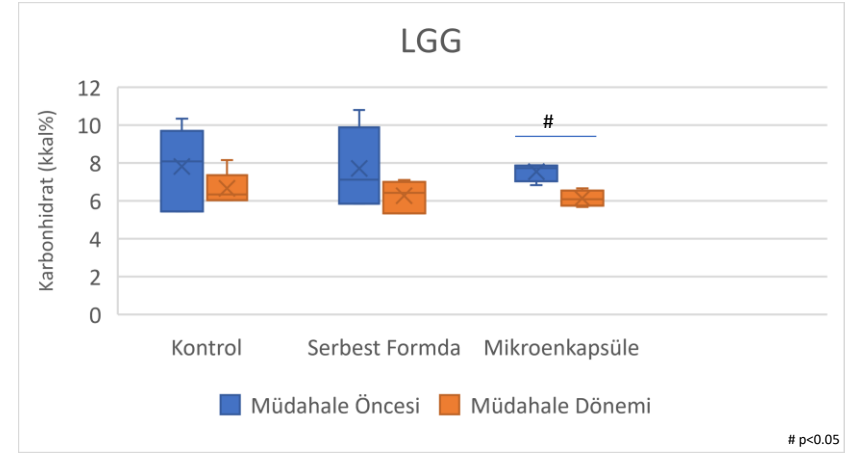
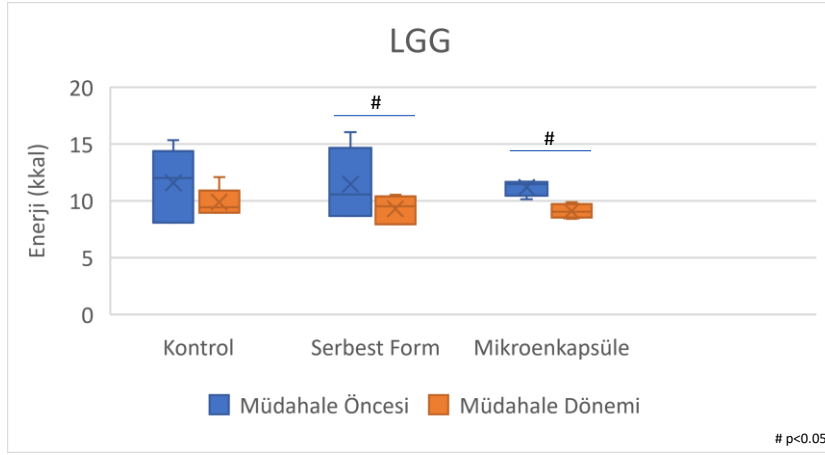
EcN verilen gruplara bakıldığında ise müdahale öncesi ve müdahale dönemlerinde enerji düzeyleri açısından aradaki fark sadece mikroenkapsüle EcN verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.01$) (Grafik 4.5). Makrobesin ögelerinin müdahale öncesi ve dönemindeki düzeylerine bakıldığında ise; kontrol ve serbest EcN verilen gruplarda tüm makrobesin ögeleri düzeylerine göre farklılık olmadığı, mikroenkapsüle EcN verilen grupta tüm makrobesin ögesi alım düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gösterilmiştir (Grafik 4.5).

Müdahale döneminde farelerin ağırlık değişimleri, yem tüketim miktarları, enerji alım düzeyleri ve makrobesin ögesi miktarları ile inflamasyon biyogöstergeleri arasındaki ilişkiye bakılmış, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (EK-3).

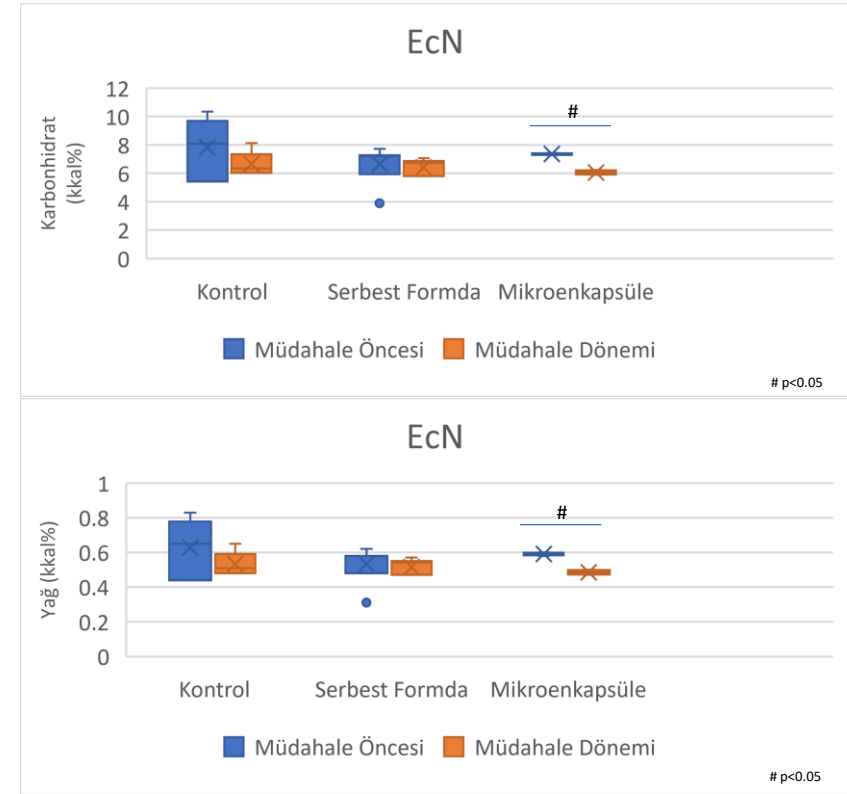
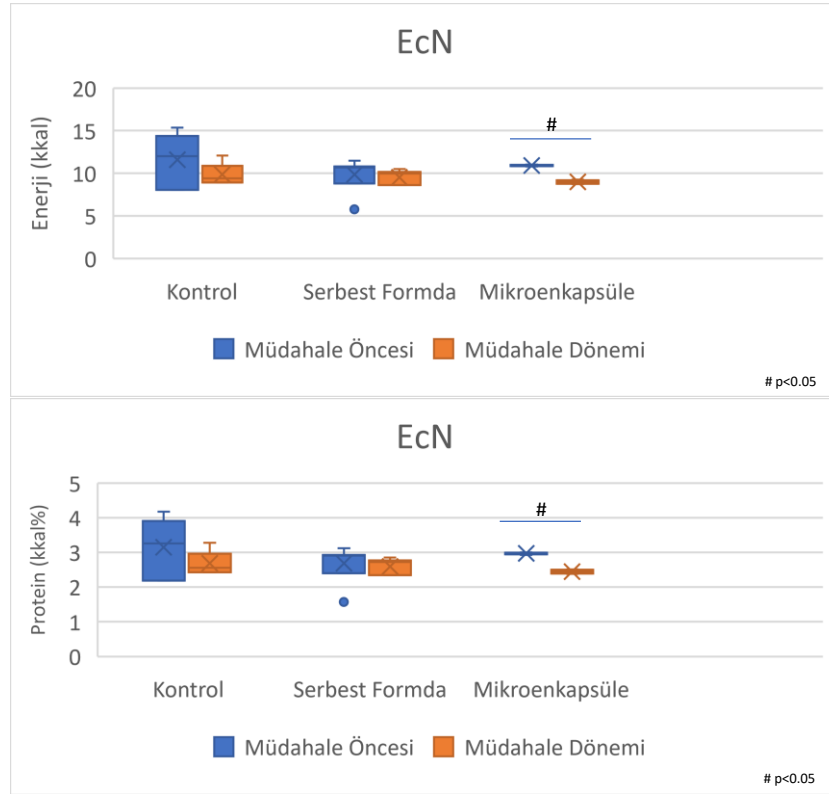
Tablo 4.7. Müdahale öncesi ve sonrası dönemlerde farklı gruplarda enerji ve makro besin ögesi alım düzeyleri.

Müdahale Dönemi	Bakteri Türleri							
	LGG				EcN			
	Kontrol n=6	Serbest Form n=6	Mikroenkapsüle n=8	p *	Kontrol n=6	Serbest Form n=7	Mikroenkapsüle n=8	p *
Müdahale Öncesi								
Enerji (kkal)	11,58±3,01	11,44±3,02	11,19±0,66	0,846	11,58±3,01	9,86±1,98	10,91±0,09	0,114
Karbonhidrat (% enerji)	7,80±2,03	7,71±2,03	7,54±0,45	0,846	7,80±2,03	6,64±1,33	7,36±0,06	0,114
Yağ (% enerji)	0,63 ±0,16	0,62±0,16	0,60±0,04	0,846	0,63 ±0,16	2,68±0,54	0,59±0,00	0,114
Protein (% enerji)	3,15±0,82	3,11±0,82	3,04±0,18	0,846	3,15±0,82	0,53±0,11	2,97±0,02	0,114
Müdahale Dönemi	Kontrol n=6	Serbest Form n=6	Mikroenkapsüle n=8	p *	Kontrol n=6	Serbest Form n=7	Mikroenkapsüle n=8	p *
Enerji (kkal)	9,87±1,22	9,28±1,13	9,08±,57	0,412	9,87±1,22	9,52±,82	8,99±,20	0,174
Karbonhidrat (% enerji)	6,66±,82	6,26±,76	6,12±,39	0,412	6,66±,82	6,42±,55	6,06±,13	0,174
Yağ (% enerji)	,053±,07	0,50±,06	0,49±,03	0,412	0,53±,07	0,51±,04	0,49±,01	0,174
Protein (% enerji)	2,69±,33	2,53±,31	2,47±,16	0,412	2,69±,33	2,59±,22	2,45±,05	0,174

*Non-parametrik, Kruskall Wallis testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak verilmiştir. LGG, *Lactobacillus rhamnosus*; EcN, *Escherichia coli Nissle 1917*.



Grafik 4.4. Müdahale öncesi ve sonrası dönemde LGG verilen grupların ortalama enerji ve makro besin ögesi alım düzeyleri.



Grafik 4.5. Müdahale öncesi ve sonrası dönemde ECN verilen grupların ortalama enerji ve makro besin ögesi alım düzeyleri.

4.3.5. DeneY Hayvanlarının İnfiamasyonla İlişkili Sitokinlerin Gen Ekspresyon Düzeyleri

Çalışmanın sonunda sakrifiye edilen farelerden alınan karaciğer dokularında PCR yöntemiyle analiz edilen pro-inflamatuvar sitokinlerin gen ekspresyon düzeyleri Tablo 4.8’da verilmiştir. LGG verilen grupta IFN γ , TNF- α ve IL-6 pro-inflamatuvar sitokinlerin gen ekspresyon düzeylerinin en düşük kontrol grubunda (sırasıyla 1,39 \pm 1,16; 1,32 \pm 1,08 ve 2,04 \pm 1,59) olduğu saptanmıştır. LGG verilen grupta en yüksek IFN γ ve TNF- α ekspresyon düzeylerinin, mikroenkapsüle formda verilen grupta olduğu (sırasıyla 5,37 \pm 7,42 ve 2,54 \pm 2,32), IL-6 ekspresyon düzeylerinin ise en yüksek serbest formda verilen grupta (6,10 \pm 6,74) olduğu görülmüştür. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

EcN verilen gruplara bakıldığında ise; IFN γ , TNF- α ve IL-6 ekspresyon düzeyleri sırasıyla kontrol grubunda 1,39 \pm 1,16; 1,32 \pm 1,08 ve 2,04 \pm 1,59 ile en düşük olduğu görülmüştür. Mikroenkapsüle EcN verilen grubun ortalama IFN γ ekspresyon düzeyleri kontrol grubuyla aynı çıkmıştır (1,39 \pm 1,04). Serbest EcN verilen grupta, IFN γ ve IL-6 ekspresyon düzeylerinin en yüksek olduğu (sırasıyla 9,77 \pm 10,10 ve 9,28 \pm 9,37) ve ortalama TNF- α ekspresyon düzeylerinin ise en yüksek mikroenkapsüle formda verilen grupta (1,84 \pm 1,36) olduğu bulunmuştur. EcN verilen gruplarda ortalama IFN γ ekspresyon düzeyleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Tablo 4.8. Farklı deney gruplarında gen ekspresyonu sonucu elde edilen ortalama pro-inflamatuvar sitokin düzeyleri.

İnflamasyon biyogöstergeleri	Probiyotik Türleri						p *
	LGG						
	Kontrol grubu n=6		Serbest Formda n=6		Mikroenkapsüle n=8		
	$\bar{x}\pm ss$	Ortanca	$\bar{x}\pm ss$	Ortanca	$\bar{x}\pm ss$	Ortanca	
IFN- γ	1,39 \pm 1,16	0,95	3,46 \pm 4,96	1,48	5,37 \pm 7,42	2,00	0.626
TNF- α	1,32 \pm 1,08	0,88	2,27 \pm 2,28	1,51	2,54 \pm 2,32	1,12	0.633
IL-6	2,04 \pm 1,59	1,77	6,10 \pm 6,74	3,45	3,72 \pm 3,67	3,06	0.729
	EcN						
	Kontrol grubu n=6		Serbest Formda n=7		Mikroenkapsüle n=8		p *
	$\bar{x}\pm ss$	Ortanca	$\bar{x}\pm ss$	Ortanca	$\bar{x}\pm ss$	Ortanca	
IFN- γ	1,39 \pm 1,16	0,95	9,77 \pm 10,10	4,39	1,39 \pm 1,04	1,34	0.048
TNF- α	1,32 \pm 1,08	0,88	1,45 \pm 1,16	1,10	1,84 \pm 1,36	1,61	0.669
IL-6	2,04 \pm 1,59	1,77	9,28 \pm 9,37	4,90	6,6 \pm 7,21	3,24	0.260

*Non-parametrik, Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak verilmiştir. LGG, *Lactobacillus rhamnosus*; EcN, *Escherichia coli Nissle 1917*.

Grupların anti-inflamatuvar sitokinlerin gen ekspresyon düzeyleri PCR yöntemiyle analiz edilmiştir (Tablo 4.9). IL-4 ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna (1,25 \pm 0,87) göre, serbest LGG (3,41 \pm 2,18) ve mikroenkapsüle LGG (3,75 \pm 2,99) verilen gruplarda daha yüksek olduğu görülmüştür. Fakat gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.76$). IL-10 ekspresyon düzeylerine bakıldığında ise; mikroenkapsüle LGG verilen grupta diğer gruplara göre daha yüksek olduğu (4,01 \pm 4,88), sonrasında ise sırasıyla serbest formda LGG (2,88 \pm 3,15) verilen grupta ve kontrol grubunda (1,35 \pm 1,13) olduğu görülmüştür ($p > 0.05$).

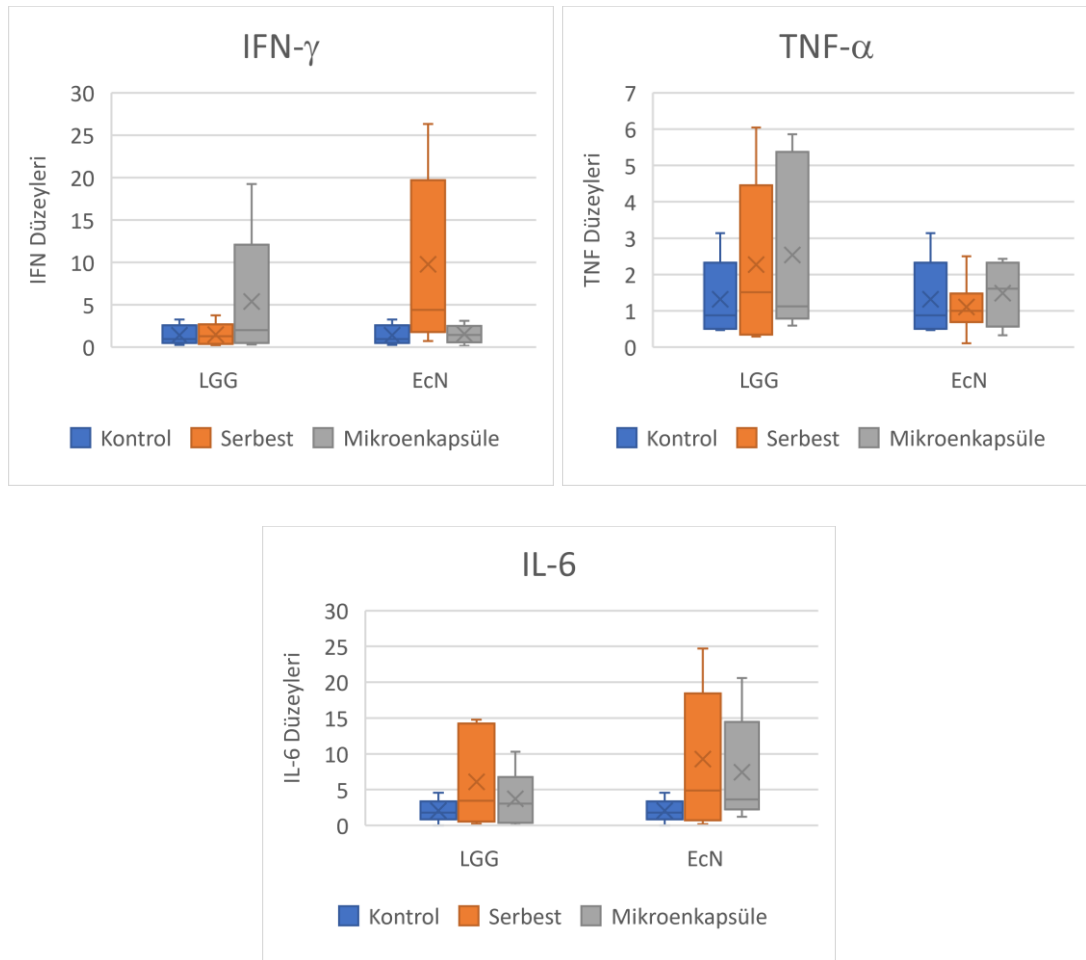
EcN verilen gruplara bakıldığında; IL-4 ekspresyon düzeylerinin serbest formda EcN verilen grupta (7,73 \pm 7,34) en yüksek olduğu bulunmuştur. Kontrol grubuna göre (1,25 \pm 0,87), mikroenkapsüle EcN grupta (2,63 \pm 1,90) IL-4 ekspresyon düzeylerinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. EcN verilen gruplar arasında IL-4 ekspresyon düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0.14$). IL-10 ekspresyon düzeylerine bakıldığında, serbest formda verilen EcN'nin (7,15 \pm 14,30), kontrol grubu (1,35 \pm 1,13) ve mikroenkapsüle EcN (1,39 \pm 1,14) verilen gruplara göre daha yüksek olduğu fakat aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p=0.260$).

Tablo 4.9. Farklı deney gruplarında gen ekspresyonu sonucu elde edilen ortalama anti-inflamatuvar sitokin düzeyleri.

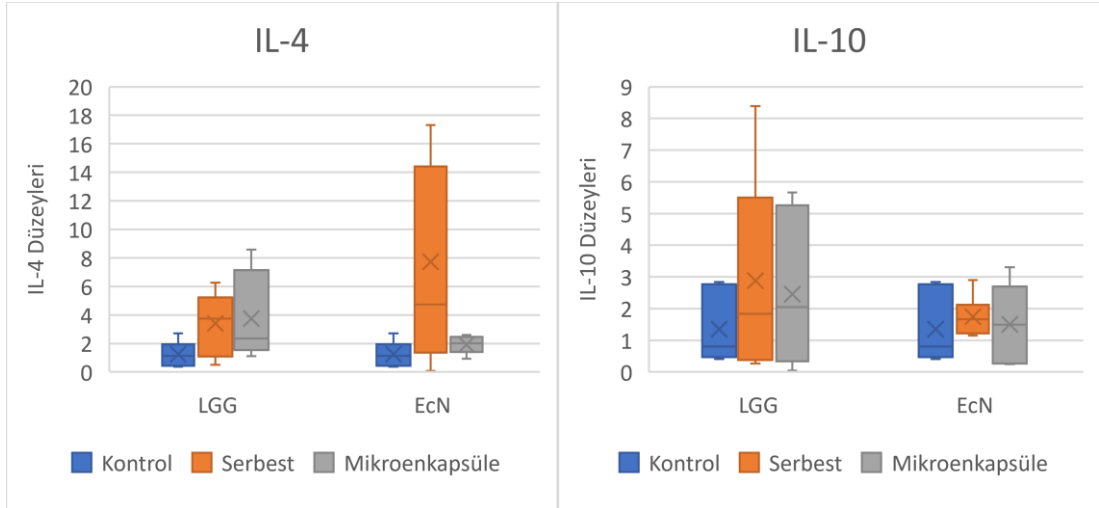
İnflamasyon biyogöstergeleri	Probiyotik Türleri						p *
	Kontrol grubu n=6		Serbest Formda n=6		Mikroenkapsüle n=8		
	$\bar{x} \pm ss$	Ortanca	$\bar{x} \pm ss$	Ortanca	$\bar{x} \pm ss$	Ortanca	
IL-4	1,25±0,87	1,14	3,41±2,18	3,75	3,75±2,99	2,36	0.760
IL-10	1,35±1,13	0,81	2,88±3,15	1,84	4,01±4,88	2,26	0.734

İnflamasyon biyogöstergeleri	EcN						p *
	Kontrol grubu n=6		Serbest Formda n=7		Mikroenkapsüle n=8		
	$\bar{x} \pm ss$	Ortanca	$\bar{x} \pm ss$	Ortanca	$\bar{x} \pm ss$	Ortanca	
IL-4	1,25±0,87	1,14	7,73±7,34	4,74	2,63±1,90	2,39	0.141
IL-10	1,35±1,13	0,81	7,15±14,30	1,74	1,39±1,14	1,10	0.260

*Non-parametrik, Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak verilmiştir. LGG, *Lactobacillus rhamnosus*; EcN, *Escherichia coli Nissle 1917*.



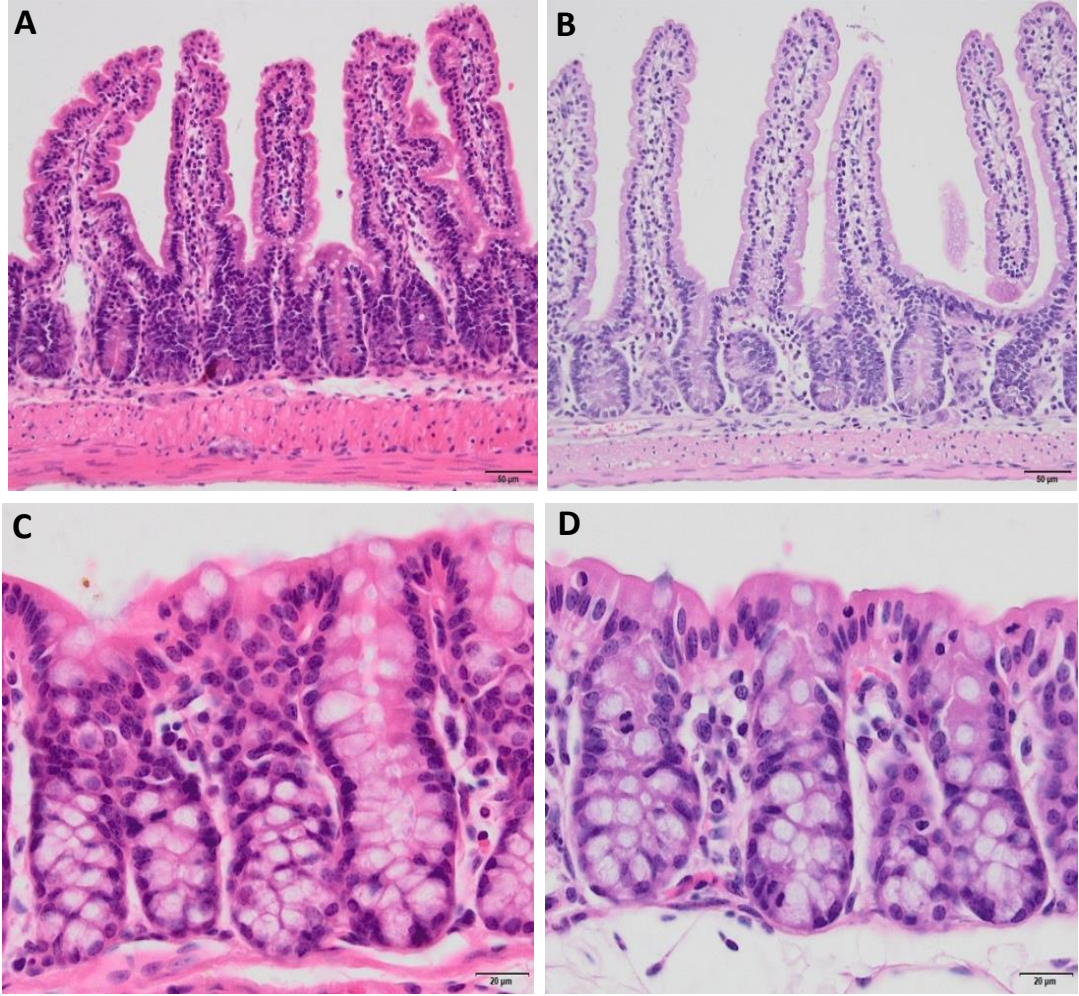
Grafik 4.6. Farelerden elde edilen karaciğer dokusunun gruplara göre pro-inflamatuvar sitokinlerin gen ekspresyon düzeyleri.



Grafik 4.7. Farelerden elde edilen karaciğer dokusunun gruplara göre anti-inflamatuvar sitokinlerin gen ekspresyon düzeyleri.

4.3.6. Deney Hayvanlarının Histopatolojik Bulguları

Kontrol grubu (A) ve serbest LGG verilen grup (B) farelerin ince bağırsaklarında inflamasyonu veya başka bir patolojiyi düşündüren bulguya rastlanmamıştır. Kontrol grubu (C) ve serbest LGG verilen grup (D) farelerin kolonlarında inflamasyonu veya başka bir patolojiyi düşündüren bulguya rastlanmamıştır.



Resim 4.1. Kontrol ve serbest LGG verilen gruptan alınan ince bağırsak dokularının görünümü. A ve B için ölçek: 50 µm. C ve D için ölçek: 20 µm.

5. TARTIŞMA

Probiyotiklerin sağlık üzerine etkileri, yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir. Fakat probiyotiklerin canlılığı ve etkinliği; mide asidi, safra, belli iyonlardaki artış, besin ögesi kompozisyonu, osmotik basınç, oksidatif stres ve gastrointestinal sistemden geçiş süresine göre değişiklik göstermektedir. Probiyotiklerin belirtilen olumsuzluklardan korunması için biyo-teknolojik bir araç olarak enkapsülasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Özellikle probiyotiklerin enkapsülasyonunda en sık kullanılan iki yöntem; mikroenkapsülasyon ve nanofiber ile enkapsülasyon yöntemleridir. Fakat geliştirilen bu yöntemlerin etkinliği, sadece *in vitro* koşullarda değerlendirilmiş, temel hedef olan insan sağlığını geliştirmeyi amaçlayan bu ürünlerin etkilerine yönelik hayvan ya da insan çalışmasına literatürde oldukça az rastlanmıştır. Ayrıca aynı probiyotik bakterilerin farklı yöntemlerle enkapsüle edildiğinde yöntem etkinliklerini karşılaştıran çalışma bulunmamaktadır. Probiyotik bakterilerle ilgili yapılan çalışmalar sıklıkla hasta gruplarda çalışılmıştır. Fakat günümüzde artan besin desteği kullanımı düşünüldüğünde sağlıklı bireylerin probiyotik kullanımı sonrası inflamasyon üzerindeki etkileriyle ilgili yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır.

Bu sebeple, konuyla ilgili yapılan ve alanında ilk olan bu çalışmaya dahil edilen LGG ve EcN; probiyotik enkapsülasyonunda kullanılan mikroenkapsülasyon yöntemi ve nanofiber ile enkapsüle edilmiş, etkinlikleri *in vitro* koşullarda değerlendirildikten sonra üretilen ürünlerin *in vivo* koşullarda sağlıklı farelerde inflamasyon üzerine etkileri araştırılmıştır. *in vitro* ve *in vivo* deneyleri sonrası elde edilen veriler LGG ve EcN bakterileri için ayrı değerlendirilmiştir.

5.1. Farklı Yöntemlerle Enkapsüle Edilen Probiyotik Bakterilerin *in vitro* Koşullarda Canlılığının Değerlendirilmesi

Çalışma kapsamında ilk defa farklı enkapsülasyon yöntemleri *in vitro* koşullarda karşılaştırılmıştır. Farklı yöntemlerde kullanılmak üzere benzer kapsül materyal kullanımının hedeflenmesine karşın mikroenkapsülasyon yönteminde iki, nanofiber ile enkapsülasyonda ise tek polimer, kapsül materyali kullanılmıştır. Emülsiyon yöntemiyle mikroenkapsülasyonda, tek polimer kullanıldığında etkinliğinin düşük olduğu, bu yüzden destek bir materyal kullanımının etkinliği büyük oranda arttıracığı bildirilmiştir (210). Özellikle toksik olmadığı ve canlılığı çevresel

koşullara daha duyarlı olan probiyotik gibi maddelerin kapsülasyonuna daha uygun bir materyal olduğu için yapılan çalışmada, sodyum aljinat kaplama materyali olarak tercih edilmiştir (31, 39, 162). Mikroenkapsülasyon işleminde aljinatın tek başına etkinliğinin yetersiz kalabileceği özellikle mide gibi asidik koşullarda aljinatın dayanıklı bir materyal olmadığı belirtilmiştir (210). Bu nedenle asidik koşullara dayanıklı (pH 5'ten daha düşük) fakat pH 6'dan daha yüksek koşullarda çözünebilen selüloz asetat fitalat, emülsiyon işleminde destek materyal olarak tercih edilmiştir. Özellikle gastrointestinal koşullara oldukça duyarlı olduğu bilinen probiyotik bakterilerin enkapsülasyonunda selüloz asetat fitalat kullanımının, simüle gastrik koşullarda mikroorganizmalar için oldukça koruyucu olduğu bildirilmiştir (211). Nanofiber ile enkapsülasyonda ise, selüloz asetatın salınım hızının oldukça yavaş olmasından dolayı, polimer olarak tercih edilmemiştir. Selüloz asetatın tam salınımın gerçekleşmesi için gereken sürenin, toplam sindirim için gereken süreden daha fazla olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (212, 213). Bu nedenle nanofiberle enkapsülasyon yönteminde ek materyal olarak selüloz asetat kullanımının uygun olmayacağı belirtilmiştir (212). Belirtilen sebeplerden dolayı çalışmada mikroenkapsülasyonda selüloz asetat ek materyal olarak kullanılırken, nanofiberle enkapsülasyon işlemlerinde kapsül materyali olarak tek materyal kullanılmıştır.

Çalışmanın *in vitro* aşamasında, nanofiberle enkapsüle edilen ve mikroenkapsüle edilen EcN ve LGG bakterilerin simüle mide ve bağırsak çözeltilerindeki canlılık düzeyleri serbest formda bulunan bakterilere göre değerlendirilmiştir. Bağırsak koşullarına maruziyet sonrası tüm grupların canlılık düzeylerinde ciddi bir azalma olduğu görülmüştür (Grafik 4.1a ve Grafik 4.1b). Serbest formda bulunan bakterilerin sindirim simülasyonu sonucu canlılık düzeylerindeki azalma, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Mikroenkapsüle LGG ve mikroenkapsüle EcN probiyotik bakterileri için de benzer sonuçlar elde edilmiş, simülasyon sonucu canlılık düzeylerinde anlamlı bir azalma olmuştur (Tablo 4.1). Nanofiber ile enkapsüle edilen probiyotik bakterilerde ise canlılık düzeylerinde azalma olduğu gösterilmesine rağmen her iki bakteri türü için de azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür (Tablo 4.1). Yapılan çalışmalarla paralel olarak; kullanılan yöntemden bağımsız olarak enkapsülasyon

işleminin mide koşullarına karşı koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (198, 214-216).

Li ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada (198); LGG probiyotik bakteriler, farklı materyaller kullanılarak dondurarak kurutma yöntemi ile enkapsüle edilmiştir. Serbest formda bulunan bakterilerin canlılığında mide çözültisi içinde 2 saatte 7.5 log'luk bir azalma olduğu, farklı içerikte materyal ile enkapsüle edilen probiyotik bakterilerin canlılığında ise 2 log'luk ve <1 log'luk azalma olduğu gösterilmiştir. Çalışmanın sonunda kullanılan farklı materyallerden bağımsız olarak enkapsülasyon işleminin simüle mide koşullarında koruyucu etkilerinin olduğu belirtilmiştir. Yapılan çalışmadan farklı olarak serbest formda bulunan bakterilerin azalma düzeyinin daha fazla olmasının nedeni, simüle mide çözültisinin pH değerinin (pH 1.6) yapılan çalışmadan (pH 3) farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Aynı çalışmada, pH'nın 3 olduğu durumlarda, serbest formda bulunan bakterilerin canlılığında anlamlı bir azalmanın olmadığı da gösterilmiştir.

Benzer şekilde selüloz asetat ve polivinil alkolün duvar materyali olarak kullanıldığı bir çalışmada (214); *L. plantarum* elektroegirme yöntemiyle enkapsüle edilmiştir. Çalışmanın sonunda enkapsüle edilen bakterilerin canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmezken, serbest formda bulunan bakterilerin canlılığında anlamlı bir azalma olduğu bulunmuştur.

Yapılan çalışmada, serbest halde bulunan EcN probiyotik bakterilerinin simüle mide koşullarında canlılığının, LGG probiyotik bakterilere kıyasla daha fazla azaldığı bulunmuştur (Tablo 4.2). Bu durum, LGG probiyotik bakterilerin ekzopolisakkaritlerin (EPS) üretme yeteneğiyle ilişkilendirilebilir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ve hücre zarına bağlanan EPS'lerin, bakterilerin etrafını sararak koruyucu bir tabaka oluşturduğu, bunun sonucunda da gastrointestinal sistem boyunca mikroorganizmaların canlılığını sürdürmesini sağladığı belirtilmiştir (198, 217). EPS'lerin ayrıca gastrointestinal sistemde sindirilmediği için prebiyotik özellik gösterdiği de bildirilmiştir (218).

Konuyla ilgili yapılan literatür taramalarında; farklı probiyotik bakterilerin farklı yöntemler ve farklı materyallerle enkapsüle edilerek *in vitro* koşullarda canlılık düzeylerinin araştırıldığı görülmektedir (198, 214). Aynı zamanda çalışmalarda belirlenen simüle mide ya da bağırsak çözültisi parametrelerinin de birbirinden farklı

olduğu görülmüştür. Bu durum çalışma sonuçlarını karşılaştırmayı oldukça zorlaştırmakta ve elde edilen sonuçların farklılığını açıklar niteliktedir. Fakat yapılan tüm çalışmalarda bahsedilen değişkenlerden bağımsız olarak, enkapsülasyonun, serbest halde bulunan bakterilere göre canlılığı büyük ölçüde koruduğu belirtilmiştir (212, 214).

5.2. Depolamanın Canlılık Üzerine Etkisi

Çalışmanın *in vitro* kısmında mikroenkapsülasyon yöntemiyle enkapsüle edilen probiyotik bakterilerin canlılık düzeyleri, nanofiber ile enkapsüle edilen probiyotik bakterilerin canlılığına göre daha yüksek bulunduğundan; çalışmanın *in vivo* kısmı için üretilecek olan mikroenkapsüle bakterilerin depolama (+4°C) koşullarındaki canlılık düzeyleri analiz edilmiştir. Birinci, üçüncü ve yedinci günlerdeki mikroenkapsüle bakterilerin ve serbest formda bulunan bakterilerin canlılığında anlamlı bir azalma olmadığı görülmüştür (Tablo 4.3).

Yapılan çalışmalarda; farklı yöntem ve materyallerle enkapsüle edilen probiyotiklerin depolama süresince, canlılığını büyük oranda koruduğu gösterilmiştir (175, 212, 219, 220). Uzun süre depolama yapıldığında serbest formda bulunan bakterilerin canlılığında azalma olduğu görülürken enkapsüle edilen probiyotiklerin canlılığında anlamlı bir azalma olmadığı belirtilmiştir (175, 212). Yapılan bir çalışmada (175); karreganan ile mikroenkapsüle edilen *B. longum* B6 ve *B. longum* ATCC 15708 bakterilerinin yoğurt içerisine eklenerek, buzdolabı koşullarında 30 gün boyunca canlılık düzeylerine bakılmıştır. Çalışmanın sonunda serbest formda bulunan *B. longum* B6 ve *B. longum* ATCC 15708 bakterilerinin canlılık düzeylerini sırasıyla %89.3 ve %91.8 oranında kaybettiği bulunmuştur. Enkapsüle edilen bakterilerin ise canlılığında anlamlı bir azalma olmadığı gösterilmiştir. Her iki bakteride de ilk beş günde anlamlı bir azalma olmamıştır (sırasıyla %16.0, %26.6).

Kısa süreli depolama durumlarında, enkapsülasyon parametrelerinden bağımsız olarak probiyotiklerin canlılık düzeylerinde anlamlı bir azalmanın olmadığı görülmüştür (220, 221). Çalışmada, farelere verilecek ürünlerin üretim sıklığının belirlenmesi amacıyla depolamayla canlılık düzeylerindeki değişimler analiz edildiği için, kısa süreli (1 hafta) depolama tercih edilmiştir. Belirtilen koşullarda depolamanın

serbest formda bulunan probiyotiklerin canlılığında bile anlamlı bir azalmaya neden olmadığı gösterilerek, diğer çalışmalarla paralel sonuçlar elde edilmiştir.

5.3. Enkapsüle Edilen Probiyotik Bakterilerin *in vivo* Koşullarda Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Gram (-) ve gram (+) iki probiyotik bakterinin farklı iki yöntemle enkapsülasyonu ve *in vitro* koşullarda yöntem karşılaştırması ilk defa bu çalışma kapsamında yapılmıştır. Buradan elde edilen sonuçlar doğrultusunda çalışmanın *in vivo* kısmına; etkinliğinin daha iyi olduğu gösterilen mikroenkapsüle probiyotik bakteriler ile devam edilmiştir. Mikroenkapsüle formda bulunan probiyotik bakterilerin ilk olarak sağlıklı farelerde denendiği çalışmanın bu kısmında; farelerin vücut ağırlığı değişimleri, histopatolojik değerlendirme ve karaciğer dokularında inflamasyonla ilişkili sitokinlerin ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiştir.

5.3.1. Deney Hayvanlarının Vücut Ağırlığı Değişimlerinin Değerlendirilmesi

Çalışmada farelerin vücut ağırlığındaki değişimleri temel olarak farelerin genel sağlık durumunu yansıttığı için her gün değerlendirilmiştir. Yapılan hayvan çalışmalarında kullanılması planlanan oral gavaj boyutunun; farelerin vücut ağırlıklarına göre belirlenmesi gerektiği bildirilmiştir (222, 223). Çalışma kapsamında hazırlanan probiyotik ürünler, tüm gruplara aynı boyuttaki oral gavaj ile verildiğinden, çalışmanın sonucunu etkilememesi amacıyla çalışmaya dahil edilen farelerin benzer ağırlıkta olmalarına dikkat edilmiştir. Çalışmanın başında ve standardizasyon dönemi sonunda ortalama vücut ağırlıkları açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmadığı saptanmıştır (Tablo 4.4).

Probiyotiklerin vücut ağırlığı üzerine etkilerini değerlendiren çalışmaların büyük çoğunluğu obez fareler ile yürütülmüştür (78, 224). Genel olarak yapılan çalışmaların sonucuna bakıldığında; probiyotik müdahalesinde bulunulan gruplarda vücut ağırlığında ve vücut yağ oranlarında azalma olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmada; müdahale başlangıcına kıyasla, müdahale sonunda tüm grupların ortalama vücut ağırlıklarında artış olmuş, bu artışın en fazla kontrol grubunda olduğu görülmüştür (Tablo 4.4). Fakat bu artış hem LGG verilen gruplar hem de EcN verilen

gruplar için istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Standardizasyon dönemine kıyasla, probiyotik müdahalesinin uygulandığı dönemdeki ortalama vücut ağırlıklarında ise kontrol grubunda hafif bir artış olduğu görülürken, probiyotik verilen grupların (LGG ve EcN) vücut ağırlıklarında azalma olduğu görülmüştür (Tablo 4.5).

Türe bağlı olarak probiyotiklerin vücut ağırlığı üzerindeki etkilerinin farklı olduğu bildirilmiştir (225). Çalışmada benzer şekilde, EcN ve LGG verilen gruplarda vücut ağırlığındaki değişimlerin farklı olduğu saptanmıştır (Grafik 4.2). EcN probiyotik bakterilerinin LGG probiyotik bakterilere göre vücut ağırlığında daha fazla azalmaya neden olduğu görülmüştür ($p>0.05$). Fakat bu probiyotik türlerinin, vücut ağırlığı ve obezite üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi için (örn. vücut yağ oranlarının ya da Lee İndekslerinin de değerlendirmeye katıldığı) daha kapsamlı bir çalışma yapılması gerekmektedir.

Altı haftalık probiyotik müdahalesi süresince; serbest EcN ($p=0.018$), mikroenkapsüle LGG ($p=0.012$) ve mikroenkapsüle EcN ($p=0.0122$) verilen gruplarda ilk hafta ve son haftadaki ortalama vücut ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (Tablo 4.4). Kontrol grubu ($p=0.122$) ve serbest formda LGG verilen gruptaki ($p=0.526$) haftalık ortalama vücut ağırlığı değişimlerinde ise anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 4.4). Yapılan çalışmalarda oral gavaj ile müdahalenin, vücut ağırlığında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (226-228). Çalışmada da, diyet müdahalesi oral gavaj ile yapıldığı için ilk haftalarda genel olarak tüm grupların vücut ağırlıklarında azalma olduğu, sonraki haftalarda ise gavaja alıştıkları için vücut ağırlıklarında bir artış olduğu görülmüştür.

Yapılan bir çalışmada (229); 15 haftalık alıştırma dönemi sonrasında altı hafta boyunca oral gavaj müdahalesinin fareler üzerindeki fizyolojik parametreler, vücut ağırlıkları, besin alımları, mortalite oranları ve organlar üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmada; oral gavaj yapılan ve yapılmayan grupların her ikisi için de, alıştırma döneminin başındaki ortalama vücut ağırlıkları ile çalışmanın sonundaki ortalama vücut ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gösterilmiştir. Fakat çalışmanın sonunda oral gavaj yapılan grubun ortalama vücut ağırlığındaki artış ile kontrol grubundaki ortalama vücut ağırlığındaki artış arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Çalışma sonunda; oral gavaja bağlı stres ve mortalitenin minimal düzeyde olduğu belirtilmiştir. Yapılan bu çalışmada da benzer

şekilde, başlangıçta hem farelerin hem de araştırmacının alışma süresinde strese bağlı tüm gruplarda vücut ağırlığında bir azalma olduğu görülürken sonraki haftalarda vücut ağırlığında artış olduğu görülmüştür ($p_{1.hafta-6.hafta} < 0.05$) (Tablo 4.4).

Yapılan önceki çalışmalardan elde edilen sonuçlar; bu çalışma sonuçları ile benzer şekilde, özellikle müdahale döneminde farelerin vücut ağırlığını etkileyebilecek faktörlerin arasında besleme yönteminin olabileceği yönündedir.

5.3.2. Deney Hayvanlarının Yem Tüketimleri ve Enerji ve Makrobesin Ögesi Alımlarının Değerlendirilmesi

Çalışmada, müdahale öncesi dönemde tüm gruplardaki farelerin yem tüketimlerinin, müdahale dönemindeki tüketimlerine göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (Tablo 4.6). Kontrol ve serbest EcN verilen gruplarda bu farklılık, istatistiksel olarak anlamlı olmamasına karşın serbest LGG, mikroenkapsüle LGG ve mikroenkapsüle EcN verilen gruplarda müdahale öncesi ve sonrası dönemlerde tüketilen yem miktarları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 4.6). Müdahale öncesi ve müdahale döneminde ise, yem tüketimleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (sırasıyla LGG için $p=0.846$ ve $p=0.412$; EcN için $p=0.114$ ve $p=0.174$). Yem tüketimleriyle benzer şekilde; enerji düzeyleri de müdahale öncesi dönemde, müdahale dönemine kıyasla daha yüksek bulunmuştur (Tablo 4.7). Fakat kontrole kıyasla LGG verilen gruplar arasında ve EcN verilen gruplar arasında ortalama enerji ve makrobesin ögesi alım düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Yapılan bir çalışmada (230); 7 hafta boyunca farelere yüksek yağlı diyet ve yüksek yağlı diyete ek düşük dozda ve yüksek dozda LGG probiyotik bakteri verilmiştir. Çalışmanın sonunda, standart yem tüketen farelerin, yüksek yağlı diyet verilen gruba göre daha fazla yem tükettikleri görülmüş ($p<0.05$). Fakat enerji alımları arasında anlamlı bir fark olmadığı gösterilmiş. Yüksek yağlı diyete ek olarak düşük ve yüksek dozlarda probiyotik verilen gruplarda ise, yem tüketimlerinin benzer düzeylerde olduğu belirtilmiştir. Çalışmada ayrıca oral gavaj müdahalesinin ilk haftasında yem tüketimlerinde bir azalma olduğu sonraki haftalarda artış olduğu gösterilmiştir. Çalışmayla benzer şekilde (Grafik 4.3a ve Grafik 4.3b), ilk alışma

haftalarında oral gavaja bağı olarak daha olası irritasyon ve stres durumlarının farelerin besin alımlarını olumsuz yönde etkilediği düşünülmektedir.

5.3.3. Deneysel Hayvanlarının İnflamasyonla İlişkili Sitokinlerin Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Çalışmada; probiyotiklerin sağlıklı farelerdeki sistemik/mukozal bağıışıklığı ve doğal/kazanılmış bağıışıklığı nasıl etkilediğini göstermek için proinflatuvar ve anti-inflatuvar sitokinlerden TNF- α , IFN γ , IL-4, IL-6 ve IL-10'un gen ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir.

Çalışmada probiyotik müdahalesinin pro-inflatuvar sitokinlerden IFN- γ , TNF- α ve IL-6 üzerine etkilerine bakıldığında; kontrol grubuna kıyasla proinflatuvar sitokinlerin her iki probiyotik grupları için daha düşük olduğu görülmüş, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (EcN verilen gruplardaki ortalama IFN γ gen ekspresyon düzeyleri hariç, $p < 0.05$) (Tablo 4.8). Anti-inflatuvar sitokinlerden IL-4 ve IL-10 düzeylerine bakıldığında ise; en düşük düzeylerin kontrol grubunda olduğu bulunmuştur ($p > 0.05$).

Konuyla ilgili literatüre bakıldığında; inflamasyonla ilişkili hastalık geliştirilen farelerde probiyotik müdahalesinin, pro-inflatuvar sitokin düzeylerinde azalmaya ve anti-inflatuvar sitokin düzeylerinde ise artışa neden olduğu genel olarak kabul edilmektedir (78-80). Fakat bunun aksine probiyotik kullanımının inflamasyon ve hastalığa bağı semptomları da şiddetlendirebileceği bildirilmiştir (82, 231). Özellikle hastalık durumlarında hastalığa uygun probiyotik türlerinin seçilmesi, bu nedenle kritik önem taşımaktadır. Yapılan bir çalışmada (232); germ-free farelerde EcN'in patojenik etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmada EcN'nin genel olarak patojenik olmadığı belirtilmesine karşın, konak bağırsak epitel hücrelerinde bağıışıklık cevabını uyarabileceği belirtilmiştir (233). Çalışmanın sonunda, serumda TNF- α düzeylerinde anlamlı bir artış olduğu bulunmuştur. Ayrıca EcN'nin probiyotik ya da patojen olarak etki göstermesinde normal bakteri florasının varlığı ve genetik özelliklerinin etkili olduğu bildirilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada (234); gram (-) bakterilerin hücre dışına lipopolisakkarit (LPS) salınımına neden olduğu bunun sonucunda inflamatuvar sitokin salınımını indüklediği bildirilmiştir. Aynı zamanda LPS salınımıyla sağlıklı

bireylerin fekal mikrobiyotasını da etkilediği belirtilmektedir. Yapılan çalışmada ise; LGG verilen gruplara kıyasla EcN gruplarının pro-inflamatuvar sitokinlerin ekspresyon düzeyleri benzer bulunmuştur (Tablo 4.8). Antiinflamatuvar sitokinlerin ekspresyon düzeylerine bakıldığında ise serbest formda EcN verilen grupların en yüksek düzeylerde olduğu görülmüştür ($p>0.05$). Çalışmada, belirtilen olumsuz etkilere karşı EcN'nin inflamasyon göstergelerinde olumlu etkilerinin olduğu bulunmuştur. EcN'nin patojenik etkilerine yönelik yapılan bir hücre çalışmasında (235); EcN'nin genotipindeki bir defektten dolayı LPS üretemediği ve anti-inflamatuvar aktiviteyi desteklediği bildirilmiştir. EcN'nin probiyotik olarak kabul edildiği göz önünde bulundurulduğunda, bu defektin de gram (-) EcN bakterilerinin antiinflamatuvar sitokinlerin ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkilerini açıklar niteliktedir.

Kronik bağırsak hastalıkları üzerine yapılan bir derleme çalışmada (231); probiyotiklerin toll benzeri reseptörler aracılığıyla pro-inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu azalttığı belirtilmiştir. Klinik semptomları, histolojik değişimleri ve mukus üretiminde olumlu etkilerinin olduğu fakat inflamatuvar bağırsak hastalıklarının başlangıç dönemlerinde dikkatli kullanılması gerektiği ve kronik enteropatilerde etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Ayrıca ülseratif kolit hastalarında klinik semptomların arttığı da görülmüştür. Çalışmanın sonunda, bağırsakla ilgili hastalıklarda probiyotik kullanımının yararlı etkilerinin birçok çalışmada gösterilmesine rağmen, fayda ve risklerinin kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi gerektiği belirtilmiştir.

Çalışmada; aljinat ile mikroenkapsüle edilen probiyotik bakterilerle serbest formda bulunan probiyotik bakteri verilen grupların pro-inflamatuvar sitokinlerin ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 4.8). Pro-inflamatuvar sitokinlerin ekspresyon düzeyleri açısından bakıldığında kontrol grubundaki düzeylerin probiyotik verilen gruplara kıyasla daha düşük olduğu saptanmıştır (Grafik 4.6). Anti-inflamatuvar sitokinlerin ekspresyon düzeylerinin ise; her iki bakteri için de kontrol gruplarında daha düşük olduğu bulunmuştur ($p>0.05$) (Grafik 4.7). IL- 4 ve IL-10 anti-inflamatuvar sitokinlerin ekspresyon düzeylerinde LGG probiyotik bakterileri için; mikroenkapsüle formda verilen gruplarda daha fazla

bir artış olduğu görülürken, EcN probiyotik bakterileri için ise serbest formda verilen gruplarda en yüksek olduğu bulunmuştur (Tablo 4.8).

Enkapsülasyon çalışmalarında probiyotiklerin etkilerinin yanı sıra kapsül materyallerinin de etkilerinin göz önünde bulundurulması gerektiği bildirilmiştir (236). Konuyla ilgili yapılan bir çalışmada (237); mikroenkapsülasyon materyalinin inflamasyon üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Yer fıstığı proteini ve aljinat kullanılarak dondurarak kurutma yöntemi ile mikroenkapsüle edilen LGG ve *L. helveticus* probiyotik bakterileri 2 hafta boyunca kolit geliştirilen farelere verilmiştir. Çalışmanın sonunda; gruplar arasında inflamatuvar sitokinlerin ekspresyon düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Yapılan çalışmalarda (238-240); çalışmada da kullanılan sodyum aljinatın ratlarda immün cevabı indüklediği, özellikle TNF- α , IL-1 ve IL-6 sitokin düzeylerinde etkili olduğu bildirilmiştir. Konuyla ilgili yapılan bir çalışmada (241); sodyum aljinatın, adjuvant olarak kullanıldığında Th1 immün cevabı arttırdığı belirtilmektedir. Yapılan başka bir çalışmada (242); sodyum aljinatın IFN γ düzeyini arttırdığı ve IL-4 üretiminde ise azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Fakat bu etkinin kalsiyum iyonlarından da kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Çalışmada benzer şekilde mikrokapsüllerin sert ve kapsül yapıları oluşturması için Ca çözeltisi kullanılmıştır. Ca ile çapraz bağlı aljinatın da; polisakkarit kökenli adjuvantlara benzer etki gösterebildikleri fakat etki mekanizmalarının tam olarak açıklanamadığı ifade edilmiştir (243). Çalışmadan elde edilen sonuçlar; kapsül materyalinin kimyasal özellikleri, probiyotik türlerinin kullanılan materyallerle etkileşimleri ya da bakteri türlerine göre parabiyotik ya da postbiyotiklerin inflamasyon biyogöstergelerini etkileyebileceği için, bu doğrultuda değerlendirme yapmayı zorlaştırmaktadır.

Yapılan bu kapsamlı çalışma ile; farklı fizyolojik etkilere sahip gram (-) ve gram (+) probiyotik bakterilerin, aynı parametrelerle ve probiyotiklerin kapsülasyonunda en yaygın kullanılan iki farklı enkapsülasyon yöntemiyle kapsüllendiği, yöntemlerin *in vitro* koşullarda etkinliğinin değerlendirildiği ve devamında sağlıklı farelerde inflamasyon üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği ilk çalışmadır. Literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde; benzer çalışma olmadığı için, çalışma sonunda elde edilen pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinlerin

ekspresyon düzeyleri arasındaki farklılıkların nedeninin; hayvanları besleme yöntemi, bakteri türleri, enkapsülasyon yöntemleri, enkapsülasyon materyalleri, müdahale süresi, hastalık ya da sağlıklı olma durumları veya analiz yöntemlerinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışmanın *in vitro* kısmında çalışmaya dahil edilen probiyotik bakterilerin enkapsülasyonunda kullanılan yöntemlerin etkinliği karşılaştırılmıştır. Fakat çalışmada seçilen enkapsülasyon yöntemlerinde stabilitenin sağlanması için farklı materyallerin kullanılması karşılaştırmayı zorlaştırmaktadır. Yapılan literatür taramaları sonucu; mikroenkapsülasyon yönteminde tek materyal kullanımının canlı organizmaların enkapsülasyonunda yetersiz kalabileceği, bu nedenle destek bir materyalin yöntem etkinliğini arttıracığı bildirilmiştir. Bu yüzden çalışmada aljinata ek olarak selüloz asetat, destek materyal olarak kullanılmıştır. Probiyotiklerin nanofiberle enkapsülasyonu ile ilgili yapılan literatür taramalarında ise; selüloz asetatın salınım hızının sindirim süresinden daha uzun olduğu ve salınımının bu yöntemde oldukça yavaş olması nedeniyle, kapsüllerin tamamının açılmadığı belirtilmiştir. Bu nedenle çalışmanın nanofiberle enkapsülasyonunda tek polimer kullanılmıştır. Bu farklılık, çalışmada nanofiberle enkapsülasyon yönteminin *in vitro* koşullarda probiyotiklerin canlılığında daha etkin olacağı düşünülmesine karşın mikroenkapsüle probiyotiklerin canlılığının daha yüksek bulunmasını açıklar niteliktedir. Enkapsülasyon yöntemlerinde kullanılan polimerlerin farklı kimyasal özelliklerinden (fiberleşme, çözünürlük, viskozite gibi) yararlanılarak enkapsülasyon işlemleri yapıldığı için, karbonhidrat polimerlerinin aynı olması mümkün olmamıştır. Bu yüzden her iki enkapsülasyon yönteminde de koruyuculuğunun daha iyi olduğu düşünülen materyaller kullanılarak *in vitro* koşullarda yöntem karşılaştırması yapılmıştır.

Çalışmanın Kısıtlılıkları

Çalışmada kullanılan enkapsülasyon yöntemlerinin *in vitro* koşullardaki canlılık düzeyleri karşılaştırılarak bir değerlendirme yapılmıştır. Fakat tüketici hedef alınarak planlanan bu çalışmada, uzun süreli depolama koşullarındaki canlılık değişimleri analiz edilmemiş yalnızca farelere verilecek ürünlerin kısa süreli depolamadaki canlılık düzeyleri belirlenmiştir. Ticari olarak geliştirilen probiyotik

ürünlerde raf ömrü önemli bir parametre olduğu için, kullanılan yöntemlerin uzun süreli depolama koşullarındaki etkileri ileri çalışmalarla karşılaştırılabilir.

Çalışmanın *in vitro* kısmında, nanofiberle enkapsülasyon sonrası canlılık analizleri rutinde olduğu gibi iki paralel olarak yapılmıştır. Fakat istatistiksel analizler için sayının yetersiz olması sebebiyle elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu analizlerde sonuçları daha sağlıklı karşılaştırmak için teknik ve biyolojik paralel sayısı arttırılabilir.

Çalışmanın *in vivo* kısmında; inflamasyonun değerlendirilmesi için belirlenen pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinlerin analizinde gereken miktarlarda serum elde edilemediği için karaciğer dokuları kullanılarak PCR yöntemi ile gen ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Serum yerine dokuların analizde kullanılması, inflamatuvar sitokinlerin ekspresyon düzeylerinin değerlendirilmesinde gruplar arasında farklılıklara neden olabilir. Özellikle gram negatif bir bakteri olan EcN üzerinde yapılan bir çalışmada (244); farklı dokulardaki farklı MPO aktivitelerinden dolayı TNF- α düzeyleri üzerindeki etkisinin değişiklik gösterebileceği belirtilmiştir. Bu nedenle yapılacak ileri çalışmalarda dokudan yapılan analizler serumdan yapılan analizler ile desteklenmelidir.

Çalışmada enkapsülasyonda kullanılan polimerlerin, GRAS listesinde yer almasına özellikle dikkat edilmiştir. Buna karşın GRAS listesinde olmasına rağmen, bu materyallerin inflamasyonu etkileyebileceği belirtilmiştir. İnflamasyon üzerinde, çalışma kapsamında kullanılan materyallerden kaynaklı bir etkinin olup olmadığının belirlenmesi için, içerisinde probiyotik bulunmayan (boş) kapsül verilen farelerin karaciğerlerindeki sitokin düzeylerinin değerlendirilmesi önerilebilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Olumsuz çevre koşullarına karşı koruyuculuğunun artırılması için yeni teknolojik yaklaşımlardan biri olan enkapsülasyon yöntemlerinden, canlı organizmaların kapsülasyonunda en sık kullanılan nanofiberle enkapsülasyon ve mikroenkapsülasyon yöntemleri, farklı türde probiyotik bakterilerinin enkapsülasyonu için çalışma kapsamında ilk kez yapılmıştır. Çalışmalarda benzer probiyotik türleri ya da alt türlerinin etkileri karşılaştırılırken, yapılan çalışmada gram negatif ve gram pozitif bakteriler tercih edilmiştir. Özellikle gram negatif bakterilerin LPS salınımına neden olduğu ve inflamasyon üzerinde farklı etkilere neden olabileceği için bu bakteriler tercih edilmiştir. Çalışmanın devamında üretilen ürünlerin *in vitro* koşullarda canlılıklarının değerlendirildiği, yöntemlerin etkinliğinin karşılaştırıldığı ve canlılık düzeyi daha yüksek bulunan yöntem kullanılarak enkapsüle edilen farklı türdeki probiyotiklerin sağlıklı C57BL/6 türü erkek farelere verilerek inflamasyon üzerindeki etkilerinin *in vivo* koşullarda ilk kez değerlendirildiği kapsamlı çalışmadan elde edilen başlıca sonuçlar aşağıda verilmiştir.

- Probiyotiklerin yöntemden bağımsız olarak enkapsüle edilmesi, *in vitro* koşullarda canlılığı korur.
- Kısa süreli uygun koşullarda depolama, probiyotiklerin canlılığını korur.
- Gram negatif ve gram pozitif probiyotik bakterilerin *in vitro* koşullara direnci farklıdır.
- Farklı türde probiyotiklerin anti-inflamatuvar sitokin ve pro-inflamatuvar sitokin düzeyleri üzerine etkileri farklılık göstermektedir.
- Enkapsüle probiyotiklerin sağlıklı farelerde kullanımının inflamasyon üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür.

Çalışmada LGG ve EcN probiyotik bakterileri kullanılmış, sonuçlar bakteri türlerine göre ayrı değerlendirilmiştir. Çalışmanın *in vivo* aşamasında ise; kontrol grubu, serbest LGG verilen grup, mikroenkapsüle LGG verilen grup, serbest EcN verilen grup ve mikroenkapsüle EcN verilen grup olarak sonuçlar karşılaştırılmıştır. Çalışmadan elde edilen tüm sonuçlar maddeler halinde aşağıda verilmiştir.

1. Çalışmanın *in vitro* aşamasında LGG probiyotik bakterileri için, serbest formda olan bakterilerin mide koşullarında canlılıklarını $83,74 \pm 2,89$ oranında, mikroenkapsüle edilen bakterilerin $98,69 \pm 1,64$ oranında ve nanofiberle enkapsüle edilen bakterilerin ise $98,1 \pm 2,69$ oranında koruduğu saptanmıştır ($p < 0,05$).
2. Çalışmanın *in vitro* aşamasında LGG probiyotik bakterileri için, serbest formda olan bakterilerin bağırsak koşullarında canlılıklarını $35,80 \pm 1,87$ oranında, mikroenkapsüle edilen bakterilerin $41,94 \pm 1,24$ oranında ve nanofiberle enkapsüle edilen bakterilerin ise $41,24 \pm 7,05$ oranında koruduğu saptanmıştır ($p > 0,05$).
3. Çalışmanın *in vitro* aşamasında EcN probiyotik bakterileri için, serbest formda olan bakterilerin mide koşullarında canlılıklarını $64,92 \pm 0,75$ oranında, mikroenkapsüle edilen bakterilerin $101,43 \pm 4,37$ oranında ve nanofiberle enkapsüle edilen bakterilerin ise $83,46 \pm 1,86$ oranında koruduğu saptanmıştır ($p < 0,05$).
4. Çalışmanın *in vitro* aşamasında EcN probiyotik bakterileri için, serbest formda olan bakterilerin bağırsak koşullarında canlılıklarını $61,13 \pm 0,57$ oranında, mikroenkapsüle edilen bakterilerin $83,89 \pm 1,31$ oranında ve nanofiberle enkapsüle edilen bakterilerin ise $71,21 \pm 1,65$ oranında koruduğu saptanmıştır ($p < 0,05$).
5. Bir haftalık depolama ($+4^{\circ}\text{C}$) boyunca serbest formda bulunan LGG probiyotik bakterilerin canlılık düzeyleri; birinci gün $9,17 \pm 0,56$ log, kob/mL, üçüncü gün $8,29 \pm 0,35$ log, kob/mL ve yedinci gün ise $9,26 \pm 0,21$ log, kob/mL olduğu bulunmuştur ($p > 0,05$).
6. Bir haftalık depolama ($+4^{\circ}\text{C}$) boyunca mikroenkapsüle LGG probiyotik bakterilerin canlılık düzeyleri; birinci gün $8,99 \pm 0,52$ log, kob/mL, üçüncü gün $7,54 \pm 0,34$ log, kob/mL ve yedinci gün ise $7,48 \pm 0,67$ log, kob/mL olduğu bulunmuştur ($p > 0,05$).
7. Bir haftalık depolama ($+4^{\circ}\text{C}$) boyunca serbest formda bulunan EcN probiyotik bakterilerin canlılık düzeyleri; birinci gün $9,63 \pm 0,09$ log, kob/mL, üçüncü gün $9,34 \pm 0,47$ log, kob/mL ve yedinci gün ise $9,36 \pm 0,25$ log, kob/mL olduğu bulunmuştur ($p > 0,05$).

8. Bir haftalık depolama (+4°C) boyunca mikroenkapsüle EcN probiyotik bakterilerin canlılık düzeyleri; birinci gün $8,60 \pm 0,49$ log, kob/mL, üçüncü gün $8,21 \pm 0,18$ log, kob/mL ve yedinci gün ise $8,73 \pm 0,35$ log, kob/mL olduğu bulunmuştur ($p > 0.05$).
9. Çalışmanın *in vivo* kısmında; müdahale öncesi dönemde kontrol grubunun ortalama vücut ağırlığının $21,43 \pm 4,06$ g, serbest formda LGG verilen grubun $21,85 \pm 2,46$ g, mikroenkapsüle LGG verilen grubun $19,90 \pm 1,44$ g olduğu, serbest formda EcN verilen grubun $22,14 \pm 1,72$ g olduğu ve mikroenkapsüle EcN verilen grubun ise $20,73 \pm 1,13$ g olduğu gösterilmiştir ($p > 0.05$).
10. Çalışmanın *in vivo* kısmında; müdahale döneminde kontrol grubunun ortalama vücut ağırlığının $21,67 \pm 2,99$ g, serbest formda LGG verilen grubun $21,67 \pm 2,49$ g, mikroenkapsüle LGG verilen grubun $19,72 \pm 1,47$ g olduğu, serbest formda EcN verilen grubun $21,38 \pm 1,91$ g olduğu ve mikroenkapsüle EcN verilen grubun ise $20,21 \pm 0,61$ g olduğu gösterilmiştir ($p > 0.05$).
11. Çalışmanın *in vivo* kısmında; müdahale öncesi dönemde kontrol grubunun ortalama yem tüketim miktarının $4,45 \pm 1,16$ g, serbest formda LGG verilen grubun $4,40 \pm 1,16$ g, mikroenkapsüle LGG verilen grubun $4,30 \pm 0,25$ g olduğu, serbest formda EcN verilen grubun $3,79 \pm 0,76$ g olduğu ve mikroenkapsüle EcN verilen grubun ise $4,20 \pm 0,03$ g olduğu saptanmıştır ($p > 0.05$).
12. Çalışmanın *in vivo* kısmında; müdahale döneminde kontrol grubunun ortalama yem tüketim miktarının $3,80 \pm 0,47$ g, serbest formda LGG verilen grubun $3,57 \pm 0,44$ g, mikroenkapsüle LGG verilen grubun $3,49 \pm 0,22$ g olduğu, serbest formda EcN verilen grubun $3,66 \pm 0,32$ g olduğu ve mikroenkapsüle EcN verilen grubun ise $3,46 \pm 0,08$ g olduğu saptanmıştır ($p > 0.05$).
13. Çalışmaya dahil edilen farelerin müdahale öncesi dönemde ortalama enerji alım düzeylerinin; kontrol grubunda $11,58 \pm 3,01$ kkal /gün, serbest LGG verilen grupta $11,44 \pm 3,02$ kkal /gün, mikroenkapsüle LGG verilen grupta $11,19 \pm 0,66$ kkal /gün, serbest EcN verilen grupta

- 9,86±1,98 kkal/gün ve mikroenkapsüle EcN verilen grupta ise 10,91±0,09 kkal/gün olduğu gözlenmiştir (p>0.05).
14. Çalışmaya dahil edilen farelerin müdahale öncesi dönemde ortalama karbonhidrat alım düzeylerinin; kontrol grubunda 1.95±0.51 g/gün, serbest LGG verilen grupta 1.93±0.51 g/gün, mikroenkapsüle LGG verilen grupta 1.89±0,17 g/gün, serbest EcN verilen grupta 1,66±0,33 g/gün ve mikroenkapsüle EcN verilen grupta ise 1,84±0,02 g/gün olduğu gözlenmiştir (p>0.05).
15. Çalışmaya dahil edilen farelerin müdahale öncesi dönemde ortalama yağ alım düzeylerinin; kontrol grubunda 0,07±0.02 g/gün, serbest LGG verilen grupta 0,07±0.02 g/gün, mikroenkapsüle LGG verilen grupta 0,07±0,01 g/gün, serbest EcN verilen grupta 0,30±0,06 g/gün ve mikroenkapsüle EcN verilen grupta ise 0,07±0,00 g/gün olduğu gözlenmiştir (p>0.05).
16. Çalışmaya dahil edilen farelerin müdahale öncesi dönemde ortalama protein alım düzeylerinin; kontrol grubunda 0,79±0.21 g/gün, serbest LGG verilen grupta 0,35±0.21 g/gün, mikroenkapsüle LGG verilen grupta 0,76±0,05 g/gün, serbest EcN verilen grupta 0,13±0,03 g/gün ve mikroenkapsüle EcN verilen grupta ise 0,74±0,01 g/gün olduğu gözlenmiştir (p>0.05).
17. Çalışmaya dahil edilen farelerin müdahale döneminde ortalama enerji alım düzeylerinin; kontrol grubunda 9,87±1,22 kkal /gün, serbest LGG verilen grupta 9,28±1,13 kkal /gün, mikroenkapsüle LGG verilen grupta 9,08±,57 kkal /gün, serbest EcN verilen grupta 9,52±,82 kkal/gün ve mikroenkapsüle EcN verilen grupta ise 8,99±,20 kkal/gün olduğu gözlenmiştir (p>0.05).
18. Çalışmaya dahil edilen farelerin müdahale döneminde ortalama karbonhidrat alım düzeylerinin; kontrol grubunda 1.67±0.21 g/gün, serbest LGG verilen grupta 1.56±0.19 g/gün, mikroenkapsüle LGG verilen grupta 1.53±0,10 g/gün, serbest EcN verilen grupta 1,61±0,14 g/gün ve mikroenkapsüle EcN verilen grupta ise 1,52±0,03 g/gün olduğu gözlenmiştir (p>0.05).

19. Çalışmaya dahil edilen farelerin müdahale döneminde ortalama yağ alım düzeylerinin; kontrol grubunda $0,06 \pm 0,01$ g/gün, serbest LGG verilen grupta $0,05 \pm 0,01$ g/gün, mikroenkapsüle LGG verilen grupta $0,05 \pm 0,01$ g/gün, serbest EcN verilen grupta $0,06 \pm 0,01$ g/gün ve mikroenkapsüle EcN verilen grupta ise $0,05 \pm 0,01$ g/gün olduğu gözlenmiştir ($p > 0,05$).
20. Çalışmaya dahil edilen farelerin müdahale döneminde ortalama protein alım düzeylerinin; kontrol grubunda $0,67 \pm 0,08$ g/gün, serbest LGG verilen grupta $0,63 \pm 0,08$ g/gün, mikroenkapsüle LGG verilen grupta $0,62 \pm 0,04$ g/gün, serbest EcN verilen grupta $0,65 \pm 0,06$ g/gün ve mikroenkapsüle EcN verilen grupta ise $0,61 \pm 0,01$ g/gün olduğu gözlenmiştir ($p > 0,05$).
21. Çalışmanın sonunda farelerin karaciğer dokularıyla yapılan PCR analiz sonucuna göre IFN- γ ekspresyon düzeylerinin; kontrol grubunda $1,39 \pm 1,16$; serbest LGG verilen grupta $3,46 \pm 4,96$; mikroenkapsüle LGG verilen grupta $5,37 \pm 7,42$; serbest EcN verilen grupta $9,77 \pm 10,10$ ve mikroenkapsüle EcN verilen grupta $1,39 \pm 1,04$ olduğu saptanmıştır.
22. Çalışmanın sonunda farelerin karaciğer dokularıyla yapılan PCR analiz sonucuna göre TNF- α ekspresyon düzeylerinin; kontrol grubunda $1,32 \pm 1,08$; serbest LGG verilen grupta $2,27 \pm 2,28$; mikroenkapsüle LGG verilen grupta $2,54 \pm 2,32$; serbest EcN verilen grupta $1,45 \pm 1,16$ ve mikroenkapsüle EcN verilen grupta $1,84 \pm 1,36$ olduğu saptanmıştır.
23. Çalışmanın sonunda farelerin karaciğer dokularıyla yapılan PCR analiz sonucuna göre IL-6 ekspresyon düzeylerinin; kontrol grubunda $2,04 \pm 1,59$; serbest LGG verilen grupta $6,10 \pm 6,74$; mikroenkapsüle LGG verilen grupta $3,72 \pm 3,67$; serbest EcN verilen grupta $9,28 \pm 9,37$ ve mikroenkapsüle EcN verilen grupta $6,6 \pm 7,21$ olduğu saptanmıştır.
24. Çalışmanın sonunda farelerin karaciğer dokularıyla yapılan PCR analiz sonucuna göre IL-4 ekspresyon düzeylerinin; kontrol grubunda $1,25 \pm 0,87$; serbest LGG verilen grupta $3,41 \pm 2,18$; mikroenkapsüle

- LGG verilen grupta $3,75 \pm 2,99$; serbest EcN verilen grupta $7,73 \pm 7,34$ ve mikroenkapsüle EcN verilen grupta $2,63 \pm 1,90$ olduğu saptanmıştır.
25. Çalışmanın sonunda farelerin karaciğer dokularıyla yapılan PCR analiz sonucuna göre IL-10 ekspresyon düzeylerinin; kontrol grubunda $1,35 \pm 1,13$; serbest LGG verilen grupta $2,88 \pm 3,15$; mikroenkapsüle LGG verilen grupta $4,01 \pm 4,88$; serbest EcN verilen grupta $7,15 \pm 14,30$ ve mikroenkapsüle EcN verilen grupta $1,39 \pm 1,14$ olduğu saptanmıştır.
26. Çalışmanın sonunda farelerin tüm gastrointestinal sisteminin histopatolojik değerlendirmesi yapıldığında; inflamasyonu ya da başka bir patolojik durumu düşündüren bulguya rastlanmadığı sonucuna varılmıştır.

Yapılan çalışmada; probiyotiklerin enkapsülasyonunda en sık kullanılan mikroenkapsülasyon ve nanofiberle enkapsülasyon işlemleri ilk olarak gram (+) ve gram (-) olmak üzere iki farklı bakteri türünde denenmiştir. Yapılan literatür araştırmasına dayanarak aynı probiyotik türlerinde farklı enkapsülasyon yöntemlerinin *in vitro* koşullarda etkinliklerinin karşılaştırıldığı ilk çalışmadır. Yapılan çalışmalarda enkapsülasyon etkinliklerinin genellikle yalnızca *in vitro* koşullarda değerlendirildiği buna karşın asıl hedef grup olan canlılardaki etkinlikleri değerlendirilmediği görülmüştür. Sindirim simülasyonlarında enkapsülasyon işleminin olumsuz koşullara karşı probiyotikleri anlamlı düzeyde koruduğunun gösterilmesine karşın, bu etkinin *in vivo* koşullardaki farkı değerlendirilmemiştir. Bu sebeple enkapsülasyonda kullanılan materyallerin de fizyolojik etkilerinin olabileceği göz önünde bulundurularak, enkapsüle edilen ve edilmeyen probiyotiklerin etkilerinin sağlıklı farelerde *in vivo* denemeleri bu çalışma kapsamında ilk olarak yapılmıştır. Literatüre bakıldığında probiyotiklerin bazı inflamasyon parametreleri üzerindeki etkilerinin genellikle hastalık durumlarında incelendiği görülmüştür. Sağlıklı insan ya da hayvan çalışmalarında probiyotiklerin etkisini araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışma enkapsüle ve serbest formda bulunan farklı türdeki bakterilerin herhangi bir semptomun gelişmediği durumlarda inflamasyon üzerine etkilerinin değerlendirilmesi açısından yapılan ilk çalışmadır. Yapılan bu çalışmanın sonuçlarının, farklı materyaller kullanılarak nanofiberle enkapsülasyon yöntemlerinin denenmesi ve bu

doğrultuda üretilen ürünlerin etkinliklerinin sağlıklı bireylerde de değerlendirilmesine yönelik yapılacak çalışmalara yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar doğrultusunda; sağlıklı farelerin haricinde beslenmeyle ilintili hastalık geliştirilen farelerde de enkapsüle probiyotiklerin inflamasyon üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi, farklı materyaller kullanılarak nanofiberle enkapsüle edilen probiyotiklerin sağlık üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi, nano boyuttaki materyallerin dokularda herhangi bir hasara ya da değişikliğe neden olup olmadığının ileri analizlerle belirlenmesi önerilmektedir. Sinbiyotiklerin ya da fonksiyonel besin öğelerinin benzer yöntemlerle enkapsüle edilerek etkinliğinin ve sağlık üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi, ayrıca farklı diyet örüntüleriyle birlikte enkapsüle probiyotikler verildiğinde oluşabilecek değişikliklerin belirlenmesi ve enkapsüle ürünlerin uygun besinlere ilave edilerek etkinliklerinin ve canlılık düzeylerinin analiz edilmesi önerilmektedir. Bununla birlikte canlılık düzeyi ve etkinlik analizinin hücre kültürü çalışmalarıyla desteklenmesi önerilmektedir. Elde edilen veriler, sağlıklı farelerde probiyotik kullanımının, inflamasyon üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını göstermiştir. Farelerle insanlar arasında fizyolojik farklılıkların olduğu göz önüne alındığında; geliştirilmesi düşünülen tüm ürünlerin etkinliklerinin insan çalışmalarıyla da çalışılması önerilmektedir. Bununla birlikte, sağlığın korunması ve geliştirilmesi için farklı besin destekleri kullanmak yerine bireylerin fizyolojik gereksinimlerine uygun, yeterli ve dengeli beslenmeyi yaşam şekli haline getirmesinin daha etkili bir yol olacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Swanson KS, Gibson GR, Hutkins R, Reimer RA, Reid G, Verbeke K, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2020;17(11):687-701.
2. Irwin C, Khalesi S, Cox AJ, Grant G, Davey AK, Bulmer AC, et al. Effect of 8-weeks prebiotics/probiotics supplementation on alcohol metabolism and blood biomarkers of healthy adults: a pilot study. *European Journal of Nutrition*. 2018;57(4):1523-34.
3. Ferrario C, Taverniti V, Milani C, Fiore W, Laureati M, De Noni I, et al. Modulation of fecal Clostridiales bacteria and butyrate by probiotic intervention with *Lactobacillus paracasei* DG varies among healthy adults. *The Journal of Nutrition*. 2014;144(11):1787-96.
4. Guandalini S. Probiotics for prevention and treatment of diarrhea. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2011;45:S149-S53.
5. Ford AC, Quigley EM, Lacy BE, Lembo AJ, Saito YA, Schiller LR, et al. Efficacy of prebiotics, probiotics, and synbiotics in irritable bowel syndrome and chronic idiopathic constipation: systematic review and meta-analysis. *Official Journal of the American College of Gastroenterology | ACG*. 2014;109(10):1547-61.
6. Guo Z, Liu X, Zhang Q, Shen Z, Tian F, Zhang H, et al. Influence of consumption of probiotics on the plasma lipid profile: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2011;21(11):844-50.
7. Sun J, Buys N. Effects of probiotics consumption on lowering lipids and CVD risk factors: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Annals of Medicine*. 2015;47(6):430-40.
8. Khalesi S, Sun J, Buys N, Jayasinghe R. Effect of probiotics on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *Hypertension*. 2014;64(4):897-903.
9. Nikbakht E, Khalesi S, Singh I, Williams LT, West NP, Colson N. Effect of probiotics and synbiotics on blood glucose: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. *European Journal of Nutrition*. 2018;57(1):95-106.
10. Sun J, Buys NJ. Glucose-and glycaemic factor-lowering effects of probiotics on diabetes: a meta-analysis of randomised placebo-controlled trials. *British Journal of Nutrition*. 2016;115(7):1167-77.
11. Foster JA, Lyte M, Meyer E, Cryan JF. Gut microbiota and brain function: an evolving field in neuroscience. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2016;19(5).
12. Reid G, Sanders M, Gaskins HR, Gibson GR, Mercenier A, Rastall R, et al. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2003;37(2):105-18.
13. Hennessy M. What's driving growth in functional food and beverages? A convergence of nutrition, convenience and taste [online]. 2013.

14. Misra S, Pandey P, Mishra HN. Novel approaches for co-encapsulation of probiotic bacteria with bioactive compounds, their health benefits and functional food product development: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2021.
15. Shishir MRI, Xie L, Sun C, Zheng X, Chen W. Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends in Food Science & Technology*. 2018.
16. Tripathi MK, Giri SK. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*. 2014;9:225-41.
17. Markowiak P, Śliżewska K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*. 2017;9(9):1021.
18. O'Bryan C, Pak D, Crandall P, Lee S, Ricke S. The role of prebiotics and probiotics in human health. *J Prob Health*. 2013;1(108):2.
19. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*. 1995;125(6):1401-12.
20. Bengmark S. Bioecologic control of the gastrointestinal tract: the role of flora and supplemented probiotics and synbiotics. *Gastroenterology Clinics*. 2005;34(3):413-36.
21. Verma SK, David J, Chandra R. Synbiotics: Potential Dietary Supplements in Functional Foods. *Indian Dairyman*. 2012.
22. Begum PS, Madhavi G, Rajagopal S, Viswanath B, Razak MA, Venkataratnamma V. Probiotics as functional foods: potential effects on human health and its impact on neurological diseases. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*. 2017;7(2):23.
23. Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinin Genel Etiketleme ve Beslenme Yönünden Etiketleme Kuralları Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkındaki Tebliğ, (2006/34) (2017).
24. de Vos P, Faas MM, Spasojevic M, Sikkema J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*. 2010;20(4):292-302.
25. Shori AB. The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2015;4(4):423-31.
26. Moumita S, Goderska K, Johnson EM, Das B, Indira D, Yadav R, et al. Evaluation of the viability of free and encapsulated lactic acid bacteria using in-vitro gastro intestinal model and survivability studies of synbiotic microcapsules in dry food matrix during storage. *LWT-Food Science and Technology*. 2017;77:460-7.
27. Amine KM, Champagne CP, Raymond Y, St-Gelais D, Britten M, Fustier P, et al. Survival of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in Cheddar cheese during production and storage. *Food Control*. 2014;37:193-9.
28. Ghorbanzade T, Jafari SM, Akhavan S, Hadavi R. Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. *Food Chemistry*. 2017;216:146-52.

29. Bhushani JA, Anandharamakrishnan C. Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food based applications. *Trends in Food Science & Technology*. 2014;38(1):21-33.
30. de Souza Simões L, Madalena DA, Pinheiro AC, Teixeira JA, Vicente AA, Ramos OL. Micro-and nano bio-based delivery systems for food applications: In vitro behavior. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2017;243:23-45.
31. Chávarri M, Marañón I, Villarán MC. Encapsulation technology to protect probiotic bacteria. *Probiotics: InTech*; 2012.
32. Ghorani B, Tucker N. Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. *Food Hydrocolloids*. 2015;51:227-40.
33. Shori AB. Microencapsulation improved probiotics survival during gastric transit. *Hayati Journal of Biosciences*. 2017;24(1):1-5.
34. El-Salam MH, El-Shibiny S. Formation and potential uses of milk proteins as nano delivery vehicles for nutraceuticals: a review. *International journal of dairy technology*. 2012;65(1):13-21.
35. Fathi M, Martin A, McClements DJ. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*. 2014;39(1):18-39.
36. Grumezescu A. *Nutrient Delivery*: Academic Press; 2016.
37. Food and Agriculture Organization, (FAO/WHO). Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. FAO/WHO London, ON; 2002.
38. Cho KM, Lee JH, Yun HD, Ahn BY, Kim H, Seo WT. Changes of phytochemical constituents (isoflavones, flavanols, and phenolic acids) during cheonggukjang soybeans fermentation using potential probiotics *Bacillus subtilis* CS90. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2011;24(3):402-10.
39. Ding W, Shah NP. Enhancing the biotransformation of isoflavones in soymilk supplemented with lactose using probiotic bacteria during extended fermentation. *Journal of Food Science*. 2010;75(3):M140-M9.
40. Makinen K, Berger B, Bel-Rhliid R, Ananta E. Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products. *Journal of Biotechnology*. 2012;162(4):356-65.
41. Rivera-Espinoza Y, Gallardo-Navarro Y. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*. 2010;27(1):1-11.
42. Vinderola C, Reinheimer J. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*. 2003;36(9-10):895-904.
43. Butel M-J. Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2014;44(1):1-8.
44. Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics

and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2017;14(8):491.

45. Lee YK. Selection and maintenance of probiotic microorganisms. *Handbook of Probiotics and Prebiotics* Wiley-VCH, Weinheim, Germany. 2009:177-87.

46. Sanders ME, Gibson G, Gill HS, Guarner F. Probiotics: their potential to impact human health. *Council for Agricultural Science and Technology Issue Paper*. 2007;36:1-20.

47. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA). Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA Journal*. 2005;3(6):226.

48. Skokovic-Sunjic D. Clinical Guide to Probiotic Products Available in Canada 2021 [Available from: http://www.probioticchart.ca/PBCAdultHealth.html?utm_source=adult_ind&utm_medium=civ&utm_campaign=CDN_CHART].

49. Ricci A, Allende A, Bolton D, Chemaly M, Davies R, Girones R, et al. Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA. *EFSA Journal*. 2017;15(3).

50. Gao D, Liu Z, Liu F, Chen L, Wang W, Ma J, et al. Study of the immunoregulatory effect of *Lactobacillus rhamnosus* 1.0320 in immunosuppressed mice. *Journal of Functional Foods*. 2021;79:104423.

51. Di Caro S, Tao H, Grillo A, Elia C, Gasbarrini G, Sepulveda A, et al. Effects of *Lactobacillus* GG on genes expression pattern in small bowel mucosa. *Digestive and Liver Disease*. 2005;37(5):320-9.

52. Ludwig IS, Broere F, Manurung S, Lambers TT, van der Zee R, van Eden W. *Lactobacillus rhamnosus* GG-derived soluble mediators modulate adaptive immune cells. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:1546.

53. Yan F, Cao H, Cover TL, Washington MK, Shi Y, Liu L, et al. Colon-specific delivery of a probiotic-derived soluble protein ameliorates intestinal inflammation in mice through an EGFR-dependent mechanism. *The Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(6):2242-53.

54. Park K, Park S, Nagappan A, Ray N, Kim J, Yoon S, et al. Probiotic *Escherichia coli* Ameliorates Antibiotic-Associated Anxiety Responses in Mice. *Nutrients*. 2021;13(3):811.

55. Chmielewska A, Szajewska H. Systematic review of randomised controlled trials: probiotics for functional constipation. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2010;16(1):69.

56. Behnsen J, Deriu E, Sassone-Corsi M, Raffatellu M. Probiotics: properties, examples, and specific applications. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2013;3(3):a010074.

57. Crook N, Ferreira A, Gasparini AJ, Pesesky MW, Gibson MK, Wang B, et al. Adaptive strategies of the candidate probiotic *E. coli* Nissle in the mammalian gut. *Cell Host & Microbe*. 2019;25(4):499-512. e8.

58. Vandenberg PA. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews*. 1993;12(1-3):221-37.
59. Simon O, Jadamus A, Vahjen W. Probiotic feed additives-effectiveness and expected modes of action. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 2001;10:51-68.
60. Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S. Probiotics: effects on immunity. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2001;73(2):444s-50s.
61. Brandão RL, Castro IM, Bambirra EA, Amaral SC, Fietto LG, Tropaia MJM, et al. Intracellular Signal Triggered by Cholera Toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998;64(2):564-8.
62. Schachtsiek M, Hammes WP, Hertel C. Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001T surface protein Cpf mediating coaggregation with and aggregation among pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004;70(12):7078-85.
63. Oelschlaeger TA. Mechanisms of probiotic actions—a review. *International Journal of Medical Microbiology*. 2010;300(1):57-62.
64. Begley M, Hill C, Gahan CG. Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006;72(3):1729-38.
65. Collado M, Meriluoto J, Salminen S. Interactions between pathogens and lactic acid bacteria: aggregation and coaggregation abilities. *Eur J Food Res Technol*. 2008;226(5):1065-73.
66. Gill HS, Cross ML. Probiotics and Immune Function. *Nutrition and Immune Function*. 2002:251.
67. Marteau P, Shanahan F. Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2003;17(5):725-40.
68. Schatzmayr G, Zehner F, Täubel M, Schatzmayr D, Klimitsch A, Loibner AP, et al. Microbiologicals for deactivating mycotoxins. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2006;50(6):543-51.
69. Nikbakht Nasrabadi E, Jamaluddin R, Abdul Mutalib M, Khaza'ai H, Khalesi S, Mohd Redzwan S. Reduction of aflatoxin level in aflatoxin-induced rats by the activity of probiotic *Lactobacillus casei* strain S hirota. *Journal of Applied Microbiology*. 2013;114(5):1507-15.
70. Nova E, Wärnberg J, Gómez-Martínez S, Díaz LE, Romeo J, Marcos A. Immunomodulatory effects of probiotics in different stages of life. *British Journal of Nutrition*. 2007;98(S1):S90-S5.
71. Reid G, McGroarty JA, Angotti R, Cook RL. *Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. *Canadian Journal of Microbiology*. 1988;34(3):344-51.
72. Ishikawa H, Akedo I, Otani T, Suzuki T, Nakamura T, Takeyama I, et al. Randomized trial of dietary fiber and *Lactobacillus casei* administration for prevention of colorectal tumors. *International Journal of Cancer*. 2005;116(5):762-7.

73. Upadrasta A, Madempudi RS. Probiotics and blood pressure: current insights. *Integrated Blood Pressure Control*. 2016;9:33.
74. Khalesi S, Sun J, Buys N, Jayasinghe R. Effect of probiotics on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *Hypertension*. 2014; (114): 03469.
75. Ruan Y, Sun J, He J, Chen F, Chen R, Chen H. Effect of probiotics on glycemic control: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *PloS one*. 2015;10(7):e0132121.
76. de LeBlanc AdM, Chaves S, Carmuega E, Weill R, Antoine J, Perdígón G. Effect of long-term continuous consumption of fermented milk containing probiotic bacteria on mucosal immunity and the activity of peritoneal macrophages. *Immunobiology*. 2008;213(2):97-108.
77. Foligne B, Nutten S, Grangette C, Dennin V, Goudercourt D, Poiret S, et al. Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2007;13(2):236.
78. Park D-Y, Ahn Y-T, Park S-H, Huh C-S, Yoo S-R, Yu R, et al. Supplementation of *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032 in diet-induced obese mice is associated with gut microbial changes and reduction in obesity. *PloS one*. 2013;8(3):e59470.
79. Choi S-H, Lee S-H, Kim MG, Lee HJ, Kim G-B. *Lactobacillus plantarum* CAU1055 ameliorates inflammation in lipopolysaccharide-induced RAW264. 7 cells and a dextran sulfate sodium-induced colitis animal model. *Journal of Dairy Science*. 2019;102(8):6718-25.
80. Chen C-C, Kong M-S, Lai M-W, Chao H-C, Chang K-W, Chen S-Y, et al. Probiotics have clinical, microbiologic, and immunologic efficacy in acute infectious diarrhea. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2010;29(2):135-8.
81. Urbanska AM, Paul A, Bhahena J, Prakash S. Suppression of tumorigenesis: modulation of inflammatory cytokines by oral administration of microencapsulated probiotic yogurt formulation. *International Journal of Inflammation*. 2010;2010.
82. Mileti E, Matteoli G, Iliev ID, Rescigno M. Comparison of the immunomodulatory properties of three probiotic strains of *Lactobacilli* using complex culture systems: prediction for in vivo efficacy. *PloS One*. 2009;4(9):e7056.
83. Alansari MM, Sahlah SA, AlHumaid L, Singh AR. Probiotic lactobacilli: Can be a remediating supplement for pandemic COVID-19. A review. *Journal of King Saud University-Science*. 2020:101286.
84. Rajkumar H, Kumar M, Das N, Kumar SN, Challa HR, Nagpal R. Effect of probiotic *Lactobacillus salivarius* UBL S22 and prebiotic fructo-oligosaccharide on serum lipids, inflammatory markers, insulin sensitivity, and gut bacteria in healthy young volunteers: a randomized controlled single-blind pilot study. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. 2015;20(3):289-98.
85. Lammers KM, Brigidi P, Vitali B, Gionchetti P, Rizzello F, Caramelli E, et al. Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in

human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2003;38(2):165-72.

86. Sierra S, Lara-Villoslada F, Sempere L, Olivares M, Boza J, Xaus J. Intestinal and immunological effects of daily oral administration of *Lactobacillus salivarius* CECT5713 to healthy adults. *Anaerobe*. 2010;16(3):195-200.

87. Fong FY, Kirjavainen P, Wong VY, El-Nezami H. Immunomodulatory effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on dendritic cells, macrophages and monocytes from healthy donors. *Journal of Functional Foods*. 2015;13:71-9.

88. Childs CE, Röytiö H, Alhoniemi E, Fekete AA, Forssten SD, Hudjec N, et al. Xylo-oligosaccharides alone or in synbiotic combination with *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* induce bifidogenesis and modulate markers of immune function in healthy adults: a double-blind, placebo-controlled, randomised, factorial cross-over study. *British Journal of Nutrition*. 2014;111(11):1945-56.

89. Ibrahim NS, Muhamad AS, Ooi FK, Meor-Osman J, Chen CK. The effects of combined probiotic ingestion and circuit training on muscular strength and power and cytokine responses in young males. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2018;43(2):180-6.

90. Ibrahim NS, Ooi FK, Chen CK, Muhamad AS. Effects of probiotics supplementation and circuit training on immune responses among sedentary young males. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*. 2017;58(7-8):1102-9.

91. Boesmans L, Valles-Colomer M, Wang J, Eeckhaut V, Falony G, Ducatelle R, et al. Butyrate producers as potential next-generation probiotics: safety assessment of the administration of *Butyricoccus pullicaecorum* to healthy volunteers. *Msystems*. 2018;3(6):e00094-18.

92. Kelly JR, Allen AP, Temko A, Hutch W, Kennedy PJ, Farid N, et al. Lost in translation? The potential psychobiotic *Lactobacillus rhamnosus* (JB-1) fails to modulate stress or cognitive performance in healthy male subjects. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2017;61:50-9.

93. Mohr AE, Basile AJ, Meli'sa SC, Sweazea KL, Carpenter KC. Probiotic supplementation has a limited effect on circulating immune and inflammatory markers in healthy adults: A systematic review of randomized controlled trials. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 2020;120(4):548-64.

94. Klaenhammer TR, Kleerebezem M, Kopp MV, Rescigno M. The impact of probiotics and prebiotics on the immune system. *Nature Reviews Immunology*. 2012;12(10):728-34.

95. Larsen N, Vogensen FK, Gøbel RJ, Michaelsen KF, Forssten SD, Lahtinen SJ, et al. Effect of *Lactobacillus salivarius* Ls-33 on fecal microbiota in obese adolescents. *Clinical Nutrition*. 2013;32(6):935-40.

96. Gøbel RJ, Larsen N, Jakobsen M, Mølgaard C, Michaelsen KF. Probiotics to adolescents with obesity: effects on inflammation and metabolic syndrome. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2012;55(6):673-8.

97. Kadooka Y, Sato M, Imaizumi K, Ogawa A, Ikuyama K, Akai Y, et al. Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with

obese tendencies in a randomized controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2010;64(6):636.

98. Kadooka Y, Sato M, Ogawa A, Miyoshi M, Uenishi H, Ogawa H, et al. Effect of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in fermented milk on abdominal adiposity in adults in a randomised controlled trial. *British Journal of Nutrition*. 2013;110(9):1696-703.

99. Sharafedinov KK, Plotnikova OA, Alexeeva RI, Sentsova TB, Songisepp E, Stsepetova J, et al. Hypocaloric diet supplemented with probiotic cheese improves body mass index and blood pressure indices of obese hypertensive patients—a randomized double-blind placebo-controlled pilot study. *Nutrition Journal*. 2013;12(1):138.

100. Zarrati M, Salehi E, Mofid V, Zadeh-Attar MH, Nourijelyani K, Bidad K, et al. Relationship between probiotic consumption and IL-10 and IL-17 secreted by PBMCs in overweight and obese people. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*. 2013;12(4):404-6.

101. Agerholm-Larsen L, Raben A, Haulrik N, Hansen A, Manders M, Astrup A. Effect of 8 week intake of probiotic milk products on risk factors for cardiovascular diseases. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2000;54(4):288.

102. Rajkumar H, Mahmood N, Kumar M, Varikuti SR, Challa HR, Myakala SP. Effect of probiotic (VSL# 3) and omega-3 on lipid profile, insulin sensitivity, inflammatory markers, and gut colonization in overweight adults: a randomized, controlled trial. *Mediators of Inflammation*. 2014;2014.

103. Brahe LK, Le Chatelier E, Prifti E, Pons N, Kennedy S, Blädel T, et al. Dietary modulation of the gut microbiota—a randomised controlled trial in obese postmenopausal women. *British Journal of Nutrition*. 2015;114(3):406-17.

104. Ivey KL, Hodgson JM, Kerr DA, Thompson PL, Stojceski B, Prince RL. The effect of yoghurt and its probiotics on blood pressure and serum lipid profile; a randomised controlled trial. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2015;25(1):46-51.

105. Leber B, Tripolt N, Blattl D, Eder M, Wascher T, Pieber T, et al. The influence of probiotic supplementation on gut permeability in patients with metabolic syndrome: an open label, randomized pilot study. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2012;66(10):1110.

106. Tripolt N, Leber B, Blattl D, Eder M, Wonisch W, Scharnagl H, et al. Effect of supplementation with *Lactobacillus casei* Shirota on insulin sensitivity, β -cell function, and markers of endothelial function and inflammation in subjects with metabolic syndrome—A pilot study. *Journal of Dairy Science*. 2013;96(1):89-95.

107. Barreto FM, Simão AC, Morimoto HK, Lozovoy MB, Dichi I, da Silva Miglioranza LH. Beneficial effects of *Lactobacillus plantarum* on glycemia and homocysteine levels in postmenopausal women with metabolic syndrome. *Nutrition*. 2014;30(7-8):939-42.

108. Hariri M, Salehi R, Feizi A, Mirlohi M, Ghiasvand R, Habibi N. A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial on probiotic soy milk and soy milk:

effects on epigenetics and oxidative stress in patients with type II diabetes. *Genes & Nutrition*. 2015;10(6):52.

109. Tonucci LB, dos Santos KO, de Oliveira LL, Ribeiro SR, Martino HD. Clinical application of probiotics in type 2 diabetes mellitus: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Clinical Nutrition*. 2017;36(1):85-92.

110. Mohamadshahi M, Veissi M, Haidari F, Javid AZ, Mohammadi F, Shirbeigi E. Effects of probiotic yogurt consumption on lipid profile in type 2 diabetic patients: A randomized controlled clinical trial. *Journal of Research in Medical Sciences: the Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 2014;19(6):531.

111. Ejtahed HS, Mohtadi-Nia J, Homayouni-Rad A, Niafar M, Asghari-Jafarabadi M, Mofid V. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. *Nutrition*. 2012;28(5):539-43.

112. Ejtahed H, Mohtadi-Nia J, Homayouni-Rad A, Niafar M, Asghari-Jafarabadi M, Mofid V, et al. Effect of probiotic yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Dairy Science*. 2011;94(7):3288-94.

113. Andreasen AS, Larsen N, Pedersen-Skovsgaard T, Berg RM, Møller K, Svendsen KD, et al. Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. *British Journal of Nutrition*. 2010;104(12):1831-8.

114. Vajro P, Mandato C, Licenziati MR, Franzese A, Vitale DF, Lenta S, et al. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in pediatric obesity-related liver disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2011;52(6):740-3.

115. Aller R, De Luis D, Izaola O, Conde R, Gonzalez Sagrado M, Primo D, et al. Effect of a probiotic on liver aminotransferases in nonalcoholic fatty liver disease patients: a double blind randomized clinical trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2011;15(9):1090-5.

116. Nabavi S, Rafrat M, Somi M, Homayouni-Rad A, Asghari-Jafarabadi M. Effects of probiotic yogurt consumption on metabolic factors in individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Dairy Science*. 2014;97(12):7386-93.

117. Alisi A, Bedogni G, Baviera G, Giorgio V, Porro E, Paris C, et al. Randomised clinical trial: the beneficial effects of VSL# 3 in obese children with non-alcoholic steatohepatitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2014;39(11):1276-85.

118. Wang K-Y, Li S-N, Liu C-S, Perng D-S, Su Y-C, Wu D-C, et al. Effects of ingesting *Lactobacillus*-and *Bifidobacterium*-containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2004;80(3):737-41.

119. Cats A, Kuipers E, Bosschaert M, Pot R, Vandenbroucke-Grauls C, Kusters J. Effect of frequent consumption of a *Lactobacillus casei*-containing milk drink in *Helicobacter pylori*-colonized subjects. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2003;17(3):429-35.

120. Kotowska M, Albrecht P, Szajewska H. *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children: a randomized double-blind

placebo-controlled trial. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2005;21(5):583-90.

121. Sood A, Midha V, Makharia GK, Ahuja V, Singal D, Goswami P, et al. The probiotic preparation, VSL# 3 induces remission in patients with mild-to-moderately active ulcerative colitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2009;7(11):1202-9. e1.

122. Niv E, Naftali T, Hallak R, Vaisman N. The efficacy of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the treatment of patients with irritable bowel syndrome—a double blind, placebo-controlled, randomized study. *Clinical Nutrition*. 2005;24(6):925-31.

123. Wickens K, Black PN, Stanley TV, Mitchell E, Fitzharris P, Tannock GW, et al. A differential effect of 2 probiotics in the prevention of eczema and atopy: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2008;122(4):788-94.

124. Weston S, Halbert A, Richmond P, Prescott SL. Effects of probiotics on atopic dermatitis: a randomised controlled trial. *Archives of Disease in Childhood*. 2005;90(9):892-7.

125. Niers L, Martín R, Rijkers G, Sengers F, Timmerman H, Van Uden N, et al. The effects of selected probiotic strains on the development of eczema (the PandA study). *Allergy*. 2009;64(9):1349-58.

126. Gøbel R, Larsen N, Mølgaard C, Jakobsen M, Michaelsen KF. Probiotics to young children with atopic dermatitis: a randomized placebo-controlled trial. *International Journal of Probiotics & Prebiotics*. 2010;5(2):53.

127. Hertzler SR, Clancy SM. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association*. 2003;103(5):582-7.

128. Roškar I, Švigelj K, Štampelj M, Volfand J, Štabuc B, Malovrh Š, et al. Effects of a probiotic product containing *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* IM386 and *Lactobacillus plantarum* MP2026 in lactose intolerant individuals: Randomized, placebo-controlled clinical trial. *Journal of Functional Foods*. 2017;35:1-8.

129. Liu Z, Qin H, Yang Z, Xia Y, Liu W, Yang J, et al. Randomised clinical trial: the effects of perioperative probiotic treatment on barrier function and post-operative infectious complications in colorectal cancer surgery—a double-blind study. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2011;33(1):50-63.

130. Chitapanarux I, Chitapanarux T, Traisathit P, Kudumpee S, Tharavichitkul E, Lorvidhaya V. Randomized controlled trial of live *Lactobacillus acidophilus* plus *Bifidobacterium bifidum* in prophylaxis of diarrhea during radiotherapy in cervical cancer patients. *Radiation Oncology*. 2010;5(1):31.

131. Österlund P, Ruotsalainen T, Korpela R, Saxelin M, Ollus A, Valta P, et al. *Lactobacillus* supplementation for diarrhoea related to chemotherapy of colorectal cancer: a randomised study. *British Journal of Cancer*. 2007;97(8):1028.

132. Korbekandi H, Mortazavian A, Iravani S. Technology and stability of probiotic in fermented milks containing probiotics and prebiotics In: *Probiotic and prebiotic*

foods: technology, stability and benefits to the human health. Shah, NP, da Cruz, AG, Faria, JAF. Nova Science Publishers, Inc. USA; 2011.

133. Da Cruz AG, Faria JF, Saad SI, Bolini HA, Sant AS, Cristianini M. High pressure processing and pulsed electric fields: potential use in probiotic dairy foods processing. *Trends in Food Science & Technology*. 2010;21(10):483-93.

134. Madureira AR, Amorim M, Gomes AM, Pintado ME, Malcata FX. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*. 2011;44(1):465-70.

135. Nag A. Development of a microencapsulation technique for probiotic bacteria *Lactobacillus casei* 431 using a protein-polysaccharide complex. Palmerston North, New Zealand: Massey University; 2011.

136. Kailasapathy K, Supriadi D. Effect of whey protein concentrate on the survival of *Lactobacillus acidophilus* in lactose hydrolysed yoghurt during refrigerated storage. *Milchwissenschaft (Germany)*. 1996.

137. Lankaputhra W, Shah N, Britz M. Survival of bifidobacteria during refrigerated storage in the presence of acid and hydrogen peroxide. *Milchwissenschaft*. 1996.

138. Dave RI, Shah NP. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal*. 1997;7(1):31-41.

139. Anal AK, Singh H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*. 2007;18(5):240-51.

140. Stanton C, Desmond C, Coakley M, Collins JK, Fitzgerald G, Ross RP. Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. *Handbook of Fermented Functional Foods: CRC press*; 2003. p. 27-58.

141. Goldin BR, Gorbach SL, Saxelin M, Barakat S, Gualtieri L, Salminen S. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Digestive Diseases and Sciences*. 1992;37(1):121-8.

142. Ramachandran C, Rani RS, Usha A. Evaluation of safety, antimicrobial activity and probiotic properties of *Escherichia coli* Nissle 1917 isolated from Idli batter. *Research Journal of Biotechnology Vol*. 2016;11:7.

143. Charteris W, Kelly P, Morelli L, Collins J. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*. 1998;84(5):759-68.

144. Haller D, Colbus H, Gänzle M, Scherenbacher P, Bode C, Hammes W. Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastro-intestinal ecosystem: a comparative in vitro study between bacteria of intestinal and fermented food origin. *Systematic and Applied Microbiology*. 2001;24(2):218-26.

145. Marteau P, Pochart P, Bouhnik Y, Rambaud J-C. The fate and effects of transiting, nonpathogenic microorganisms in the human intestine. *Intestinal Flora, Immunity, Nutrition and Health*. 74: Karger Publishers; 1993. p. 1-21.

146. Singh S, Sharma RK, Malhotra S, Pothuraju R, Shandilya UK, Kumar A. Probiotic attributes of *Lactobacillus rhamnosus* of dairy origin and effectiveness of almond in stimulation of its growth in vitro. *Indian Journal of Dairy Science*. 2012;65(4).
147. Kullisaar T, Zilmer M, Mikelsaar M, Vihalemm T, Annuk H, Kairane C, et al. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. 2002;72(3):215-24.
148. Ahn J-B, Hwang H-J, Park J-H. Physiological responses of oxygen-tolerant anaerobic *Bifidobacterium longum* under oxygen. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2001;11(3):443-51.
149. Neffe-Skocińska K, Rzepkowska A, Szydłowska A, Kołożyn-Krajewska D. Trends and Possibilities of the Use of Probiotics in Food Production. *Alternative and Replacement Foods: Elsevier*; 2018. p. 65-94.
150. Shafiei Y. Probiotic and Synbiotic Yogurt Production Using Free or Alginate/Resistant Starch Microencapsulated *Lactobacillus plantarum*. *Role of Materials Science in Food Bioengineering: Elsevier*; 2018. p. 301-28.
151. Sagis LM. *Microencapsulation and microspheres for food applications: Academic Press*; 2015.
152. Dias DR, Botrel DA, Fernandes RB, Borges SV. Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods. *Current Opinion in Food Science*. 2017;13:31-7.
153. Robin A-L, Sankhla D. European legislative framework controlling the use of food additives. *Essential Guide to Food Additives: Royal Society of Chemistry*; 2013. p. 44-64.
154. Bakry AM, Abbas S, Ali B, Majeed H, Abouelwafa MY, Mousa A, et al. Microencapsulation of oils: a comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2016;15(1):143-82.
155. Rodriguez J, Martín MJ, Ruiz MA, Clares B. Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. *Food Research International*. 2016;83:41-59.
156. Martín MJ, Lara-Villoslada F, Ruiz MA, Morales ME. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2015;27:15-25.
157. Vandamme TF, Gbassi GK, Nguyen TL, Li X. Microencapsulation of probiotics. *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*. 2016:97-128.
158. Rokka S, Rantamäki P. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *European Food Research and Technology*. 2010;231(1):1-12.
159. Özcan T, Altun B. Süt ürünlerinde probiyotik bakterilerin mikroenkapsülasyonu I: Enkapsülasyon teknikleri. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. 2013;27(2):93-104.

160. Paéz R, Lavari L, Vinderola G, Audero G, Cuatrin A, Zaritzky N, et al. Effect of heat treatment and spray drying on lactobacilli viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion. *Food Research International*. 2012;48(2):748-54.
161. Semyonov D, Ramon O, Kaplun Z, Levin-Brener L, Gurevich N, Shimoni E. Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. *Food Research International*. 2010;43(1):193-202.
162. Kailasapathy K. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. 2002;3(2):39-48.
163. Gbassi GK, Vandamme T, Ennahar S, Marchioni E. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. *International Journal of Food Microbiology*. 2009;129(1):103-5.
164. Doherty S, Gee V, Ross R, Stanton C, Fitzgerald G, Brodkorb A. Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. *Food Hydrocolloids*. 2011;25(6):1604-17.
165. Heidebach T, Först P, Kulozik U. Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. *Journal of Food Engineering*. 2010;98(3):309-16.
166. Riaz QA, Masud T. Recent trends and applications of encapsulating materials for probiotic stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2013;53(3):231-44.
167. King AH. Encapsulation of food ingredients: a review of available technology, focusing on hydrocolloids. 1995.
168. Champagne C, Fustier P. Microencapsulation for delivery of probiotics and other ingredients in functional dairy products. *Functional Dairy Products: Elsevier*; 2007. p. 404-26.
169. Madene A, Jacquot M, Scher J, Desobry S. Flavour encapsulation and controlled release—a review. *International Journal of Food Science & Technology*. 2006;41(1):1-21.
170. Gouin S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*. 2004;15(7-8):330-47.
171. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*. 2003;13(1):3-13.
172. Sheu T, Marshal R. Microencapsulation of lactobacilli in calcium alginates gels. *Journal Food Science*. 1993;54:73-7.
173. Song SH, Cho YH, Park J. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* YIT 9018 using a microporous glass membrane emulsification system. *Journal of Food Science*. 2003;68(1):195-200.
174. Annan N, Borza A, Hansen LT. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Research International*. 2008;41(2):184-93.

175. Adhikari K, Mustapha A, Grün I, Fernando L. Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*. 2000;83(9):1946-51.
176. Desai KH, Jin Park H. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*. 2005;23(7):1361-94.
177. Mortazavian A, Razavi SH, Ehsani MR, Sohrabvandi S. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*. 2007;5(1):1-18.
178. Beristain C, Garcia H, Vernon-Carter E. Spray-dried encapsulation of cardamom (*Elettaria cardamomum*) essential oil with mesquite (*Prosopis juliflora*) gum. *LWT-Food Science and Technology*. 2001;34(6):398-401.
179. Millqvist-Fureby A, Malmsten M, Bergenståhl B. An aqueous polymer two-phase system as carrier in the spray-drying of biological material. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2000;225(1):54-61.
180. Shin Y-S, Baik B-H, Lee J-K. Liquid yogurt with encapsulated lactic acid bacteria and method for producing the same. *Google Patents*; 2002.
181. Gibbs SK, Inteaz Alli, Catherine N. Mulligan, Bernard. Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 1999;50(3):213-24.
182. Sekhon BS. Food nanotechnology—an overview. *Nanotechnology, Science and Applications*. 2010;3:1.
183. Quintanilla-Carvajal MX, Camacho-Díaz BH, Meraz-Torres LS, Chanona-Pérez JJ, Alamilla-Beltrán L, Jimenéz-Aparicio A, et al. Nanoencapsulation: a new trend in food engineering processing. *Food Engineering Reviews*. 2010;2(1):39-50.
184. Reza Mozafari M, Johnson C, Hatziantoniou S, Demetzos C. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of Liposome Research*. 2008;18(4):309-27.
185. Vidhyalakshmi R, Bhakayaraj R, Subhasree R. Encapsulation “the future of probiotics”—a review. *Adv Biol Res*. 2009;3(3-4):96-103.
186. Fathi M, Mozafari M-R, Mohebbi M. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*. 2012;23(1):13-27.
187. Matalanis A, Jones OG, McClements DJ. Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids*. 2011;25(8):1865-80.
188. Yeo Y, Baek N, Park K. Microencapsulation methods for delivery of protein drugs. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2001;6(4):213-30.
189. Wongsasulak S, Patapeejumruswong M, Weiss J, Supaphol P, Yoovidhya T. Electrospinning of food-grade nanofibers from cellulose acetate and egg albumen blends. *Journal of Food Engineering*. 2010;98(3):370-6.
190. Bhardwaj N, Kundu SC. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*. 2010;28(3):325-47.

191. Greiner A, Wendorff JH. Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angewandte Chemie International Edition*. 2007;46(30):5670-703.
192. Sill TJ, von Recum HA. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*. 2008;29(13):1989-2006.
193. Xue J, Xie J, Liu W, Xia Y. Electrospun nanofibers: new concepts, materials, and applications. *Accounts of Chemical Research*. 2017;50(8):1976-87.
194. Kriegel C, Arrechi A, Kit K, McClements D, Weiss J. Fabrication, functionalization, and application of electrospun biopolymer nanofibers. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2008;48(8):775-97.
195. Stijnman AC, Bodnar I, Tromp RH. Electrospinning of food-grade polysaccharides. *Food Hydrocolloids*. 2011;25(5):1393-8.
196. Hao S, Wang Y, Wang B, Deng J, Liu X, Liu J. Rapid preparation of pH-sensitive polymeric nanoparticle with high loading capacity using electrospray for oral drug delivery. *Materials Science and Engineering: C*. 2013;33(8):4562-7.
197. Zhang S, Kawakami K. One-step preparation of chitosan solid nanoparticles by electrospray deposition. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010;397(1-2):211-7.
198. Li R, Zhang Y, Polk DB, Tomasula PM, Yan F, Liu L. Preserving viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in vitro and in vivo by a new encapsulation system. *Journal of Controlled Release*. 2016;230:79-87.
199. Souza ÉL, Elian SD, Paula LM, Garcia CC, Vieira AT, Teixeira MM, et al. *Escherichia coli* strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis by modulating intestinal permeability, the inflammatory response and clinical signs in a faecal transplantation model. *Journal of Medical Microbiology*. 2016;65(3):201-10.
200. Sassone-Corsi M, Nuccio S-P, Liu H, Hernandez D, Vu CT, Takahashi AA, et al. Microcins mediate competition among Enterobacteriaceae in the inflamed gut. *Nature*. 2016;540(7632):280-3.
201. Sultana K, Godward G, Reynolds N, Arumugaswamy R, Peiris P, Kailasapathy K. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*. 2000;62(1-2):47-55.
202. Cakir S. Bazı Probiyotik Bakterilerin Mikroenkapsülasyonu ve Meyve Suyunda Kullanımının Araştırılması. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2021.
203. Sahadeva R, Leong S, Chua K, Tan C, Chan H, Tong E, et al. Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. *International Food Research Journal*. 2011;18(4).
204. Tokatlı M, Gülgör G, Bağder Elmacı S, Arslankoz İşleyen N, Özçelik F. In vitro properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles. *BioMed Research International*. 2015;2015.
205. Martin M, Lara-Villoslada F, Ruiz M, Morales M. Effect of unmodified starch on viability of alginate-encapsulated *Lactobacillus fermentum* CECT5716. *LWT-Food Science and Technology*. 2013;53(2):480-6.

206. Turner PV, Brabb T, Pekow C, Vasbinder MA. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2011;50(5):600-13.
207. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*. 2008;3(6):1101-8.
208. Uzun S. β -Catenin N-Terminal Bölge Değişikliklerinin Neoplastik Süreçlerdeki Rolünün Araştırılması. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2021.
209. Hayran M. Sağlık araştırmaları için temel istatistik: Omega Araştırma; 2011.
210. Emel Ü, Erginkaya Z. Probiyotik mikroorganizmaların mikroenkapsülasyonu. *Gıda*. 2010;35(4):297-304.
211. Burgain J, Gaiani C, Linder M, Scher J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*. 2011;104(4):467-83.
212. Çanga EM, Dudak FC. Improved digestive stability of probiotics encapsulated within poly (vinyl alcohol)/cellulose acetate hybrid fibers. *Carbohydrate Polymers*. 2021;264:117990.
213. Sakuldao S, Yoovidhya T, Wongsasulak S. Coaxial electrospinning and sustained release properties of gelatin-cellulose acetate core-shell ultrafine fibres. *ScienceAsia*. 2011;37(4):335-43.
214. Feng K, Huang R-m, Wu R-q, Wei Y-s, Zong M-h, Linhardt RJ, et al. A novel route for double-layered encapsulation of probiotics with improved viability under adverse conditions. *Food Chemistry*. 2020;310:125977.
215. Yilmaz MT, Taylan O, Karakas CY, Dertli E. An alternative way to encapsulate probiotics within electrospun alginate nanofibers as monitored under simulated gastrointestinal conditions and in kefir. *Carbohydrate Polymers*. 2020;244:116447.
216. Luo X, Song H, Yang J, Han B, Feng Y, Leng Y, et al. Encapsulation of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 in a chitosan—alginate matrix by combining layer-by-layer assembly with CaCl₂ cross-linking for an effective treatment of inflammatory bowel diseases. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2020;189:110818.
217. Lebeer S, Claes IJ, Verhoeven TL, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. Exopolysaccharides of *Lactobacillus rhamnosus* GG form a protective shield against innate immune factors in the intestine. *Microbial Biotechnology*. 2011;4(3):368-74.
218. Soyuçok A, Teslime E, Kılıç GB. Ekzopolisakkaritlerin özellikleri ve gıda sanayindeki önemi. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*. 2016;5:332-44.
219. Amna T, Hassan MS, Pandeya DR, Khil M-S, Hwang I. Classy non-wovens based on animate *L. gasseri*-inanimate poly (vinyl alcohol): upstream application in food engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013;97(10):4523-31.
220. Hasgucmen CK, Sengun IY. Viability of probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* and its impact on sensory properties of cheesecake during storage at -20° C and 4° C. *LWT*. 2020;134:109967.

221. Adhikari K, Mustapha A, Grün I. Survival and metabolic activity of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in stirred yogurt. *Journal of Food Science*. 2003;68(1):275-80.
222. Animal Feeding Guide [Available from: <https://www.braintreesci.com/images/fd-needlechart.pdf>].
223. Jones CP, Boyd KL, Wallace JM. Evaluation of mice undergoing serial oral gavage while awake or anesthetized. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2016;55(6):805-10.
224. de Carvalho Marchesin J, Celiberto LS, Orlando AB, de Medeiros AI, Pinto RA, Zuanon JAS, et al. A soy-based probiotic drink modulates the microbiota and reduces body weight gain in diet-induced obese mice. *Journal of Functional Foods*. 2018;48:302-13.
225. Yin Y-N, Yu Q-F, Fu N, Liu X-W, Lu F-G. Effects of four *Bifidobacteria* on obesity in high-fat diet induced rats. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2010;16(27):3394.
226. Murphy SJ, Smith P, Shaivitz AB, Rossberg MI, Hurn PD. The effect of brief halothane anesthesia during daily gavage on complications and body weight in rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2001;40(2):9-12.
227. Loveless SE, Finlay C, Everds NE, Frame SR, Gillies PJ, O'Connor JC, et al. Comparative responses of rats and mice exposed to linear/branched, linear, or branched ammonium perfluorooctanoate (APFO). *Toxicology*. 2006;220(2-3):203-17.
228. Loveless SE, Hoban D, Sykes G, Frame SR, Everds NE. Evaluation of the immune system in rats and mice administered linear ammonium perfluorooctanoate. *Toxicological Sciences*. 2008;105(1):86-96.
229. Arantes-Rodrigues R, Henriques A, Pinto-Leite R, Faustino-Rocha A, Pinho-Oliveira J, Teixeira-Guedes C, et al. The effects of repeated oral gavage on the health of male CD-1 mice. *Lab Animal*. 2012;41(5):129-34.
230. Cheng Y-C, Liu J-R. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG on energy metabolism, leptin resistance, and gut microbiota in mice with diet-induced obesity. *Nutrients*. 2020;12(9):2557.
231. Plaza-Díaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Vilchez-Padial LM, Gil A. Evidence of the anti-inflammatory effects of probiotics and synbiotics in intestinal chronic diseases. *Nutrients*. 2017;9(6):555.
232. Bleich A, Sundberg JP, Smoczek A, Von Wasielewski R, De Buhr MF, Janus LM, et al. Sensitivity to *Escherichia coli* Nissle 1917 in mice is dependent on environment and genetic background. *International Journal of Experimental Pathology*. 2008;89(1):45-54.
233. Ukena SN, Westendorf AM, Hansen W, Rohde M, Geffers R, Coldewey S, et al. The host response to the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917: specific up-regulation of the proinflammatory chemokine MCP-1. *BMC Medical Genetics*. 2005;6(1):1-13.

234. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux J-J, et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(43):16731-6.
235. Güttsches A-K, Löseke S, Zähringer U, Sonnenborn U, Enders C, Gatermann S, et al. Anti-inflammatory modulation of immune response by probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 in human blood mononuclear cells. *Innate Immunity*. 2012;18(2):204-16.
236. Ivanovska TP, Mladenovska K, Zhivikj Z, Pavlova MJ, Gjurovski I, Ristoski T, et al. Synbiotic loaded chitosan-Ca-alginate microparticles reduces inflammation in the TNBS model of rat colitis. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017;527(1-2):126-34.
237. Varankovich N, Grigoryan A, Brown K, Inglis GD, Uwiera RR, Nickerson MT, et al. Pea-protein alginate encapsulation adversely affects development of clinical signs of *Citrobacter rodentium*-induced colitis in mice treated with probiotics. *Canadian Journal of Microbiology*. 2018;64(10):744-60.
238. Otterlei M, Ostgaard K, Skjåk-Bræk G, Smidsrød O, Soon-Shiong P, Espevik T. Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate. *Journal of Immunotherapy: Official Journal of the Society for Biological Therapy*. 1991;10(4):286-91.
239. Otterlei M, Sundan A, Skjåk-Bræk G, Ryan L, Smidsrød O, Espevik T. Similar mechanisms of action of defined polysaccharides and lipopolysaccharides: characterization of binding and tumor necrosis factor alpha induction. *Infection and Immunity*. 1993;61(5):1917-25.
240. Son E, Moon E, Rhee D, Pyo S. Stimulation of various functions in murine peritoneal macrophages by high mannuronic acid-containing alginate (HMA) exposure in vivo. *International Immunopharmacology*. 2001;1(1):147-54.
241. Dobakhti F, Naghibi T, Taghikhani M, Ajdary S, Rafinejad A, Bayati K, et al. Adjuvant effect of sodium alginate on subcutaneously injected BCG in BALB/c mice. *Microbes and Infection*. 2009;11(2):296-301.
242. AbdelAllah NH, Abdeltawab NF, Boseila AA, Amin MA. Chitosan and sodium alginate combinations are alternative, efficient, and safe natural adjuvant systems for hepatitis B vaccine in mouse model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2016;2016.
243. Petrovsky N, Cooper PD. Carbohydrate-based immune adjuvants. *Expert Review of Vaccines*. 2011;10(4):523-37.
244. Arribas B, Rodríguez-Cabezas M, Camuesco D, Comalada M, Bailón E, Utrilla P, et al. A probiotic strain of *Escherichia coli*, Nissle 1917, given orally exerts local and systemic anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. *British Journal of Pharmacology*. 2009;157(6):1024-33.

8. EKLER

EK-1: Etik Kurul Raporu.



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575 - 124

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 23.10.2018 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2018/10
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2018/67
KARAR NUMARASI	: 2018/67 - 06
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Doç. Dr. Derya DİKMEN
HAYVAN DENEYLERİNDE	Arş. Gör. Berna MADALI, Doç. Dr. Derya DİKMEN
GÖREVLİ ARAŞTIRMACILAR	:
DİĞER YARDIMCI	: Arş. Gör. Lütfiye PARLAK
ARAŞTIRMACILAR	:
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 30 Adet C57BL/6J Fare (8 Hafta)

Üniversitemiz Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Derya DİKMEN'in araştırma yürütücüsü olduğu 2018/67 kayıt numaralı "*Farklı Yöntemler İle Enkapsüle Edilen Probiyotiklerin in vivo ve in vitro Etkinliğinin Belirlenmesi*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Araştırma yürütücüsü Kurulumuza araştırma projesinin bitiş tarihini bildirmek ve proje sonuç raporunu sunmak ile yükümlüdür.

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

EK-2: Probiyotiklerin MALDI-TOF analizi sonuçları.

VITEK® MS Review


<input type="checkbox"/>			21marA14m17-1					Discarded
<input type="checkbox"/>			EC8739b-1	Escherichia coli	99.9			Reviewed
<input type="checkbox"/>			RHAMNOSUSC1-1	Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus	99.9			Reviewed
<input type="checkbox"/>			EC8739-1	Escherichia coli	99.9			Reviewed
<input type="checkbox"/>			RHAMNOSUSC2-1	Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus	99.9			Reviewed
<input type="checkbox"/>			RHAMNOSUSC4-1	Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus	99.9			Reviewed
<input type="checkbox"/>			RHAMNOSUSC3-1	Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus	99.9			Reviewed
<input type="checkbox"/>			RHAMNOSUSA2-1	Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus	99.9			Reviewed
<input type="checkbox"/>			RHAMNOSUSB2-1	Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus	99.9			Reviewed
<input type="checkbox"/>			RHAMNOSUSB3-1	Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus	99.9			Reviewed
<input type="checkbox"/>			RHAMNOSUSB1-1	Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus	99.9			Reviewed
<input type="checkbox"/>			ECNISLE1-1	Escherichia coli	99.9			Reviewed
<input type="checkbox"/>			RHAMNOSUSA4-1	Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus	99.9			Reviewed
<input type="checkbox"/>			RHAMNOSUSA3-1					Discarded

EK-3: Vücut ağırlığı, yem tüketimleri, enerji makrobesin öğeleri ile inflamasyon sitokinlerinin gen ekspresyon düzeyleri arasında korelasyon.

		İnflamasyon sitokinlerin ekspresyon düzeyleri (2 ^{-ddCt})				
		TNF α	IFN γ	IL4	IL6	IL10
Ortalama Vücut ağırlığı	r	-,045	,059	-,050	-,154	,165
	P	,797	,735	,774	,378	,344
	n	35	35	35	35	35
Ortalama Yem tüketim miktarları	r	,081	,013	-,164	-,274	-,051
	P	,644	,943	,346	,111	,773
	n	35	35	35	35	35
Enerji düzeyleri	r	,081	,013	-,164	-,274	-,051
	P	,644	,943	,346	,111	,773
	n	35	35	35	35	35
Karbonhidrat alım düzeyleri	r	,081	,013	-,164	-,274	-,051
	P	,644	,943	,346	,111	,773
	n	35	35	35	35	35
Protein alım düzeyleri	r	,081	,013	-,164	-,274	-,051
	P	,644	,943	,346	,111	,773
	n	35	35	35	35	35
Yağ alım düzeyleri	r	,081	,013	-,164	-,274	-,051
	P	,644	,943	,346	,111	,773
	n	35	35	35	35	35

Non-parametrik, Pearson korelasyon testi uygulanmıştır. r: korelasyon katsayısı.

Ek-4: Tez Çalışması Orjinallik Raporu

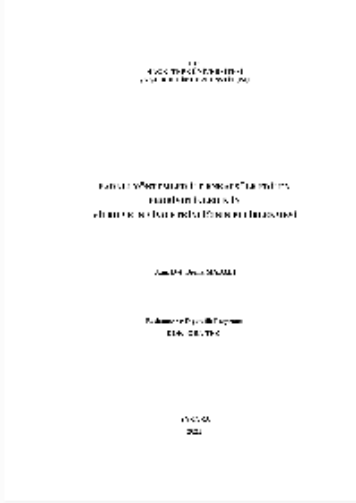


Dijital Makbuz

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: **Berna Madalı**
Ödev başlığı: **Berna Madalı_Tez**
Gönderi Başlığı: **Berna Madalı_Tez**
Dosya adı: **Turnitin_Tez_D_zeltmeler06012022.docx**
Dosya boyutu: **12.28M**
Sayfa sayısı: **126**
Kelime sayısı: **21,527**
Karakter sayısı: **156,777**
Gönderim Tarihi: **07-Oca-2022 11:29ÖÖ (UTC+0300)**
Gönderim Numarası: **1738442082**



Copyright 2022 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

Berna Madalı_Tez

ORJİNALLİK RAPORU

%3	%2	%1	%1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	sbk2019.org İnternet Kaynağı	%1
2	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	%1
3	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	%1
4	earsiv.medeniyet.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
5	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1

Alıntıları çıkart üzerinde Eşleşmeleri çıkar < %1
Bibliyografyayı Çıkart üzerinde

9. ÖZGEÇMİŞ