

İmmobilizasyonun Probiyotik Kültürlerde Kullanımı

Hatice Bozkurt¹ , Belma Aslım²

Özet:

İnsan vücudu dinamik bir ekosistem olup, trilyonlarca mikroorganizmanın konakçısı durumundadır. Bu ekosistemde bulunan mikroorganizmalar temelde faydalı ve zararlı olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Sağlıklı bir konakçıda bu iki grup dinamik bir denge halinde olup faydalı mikroorganizmalar baskın mikroflorayı oluşturmaktadır. Sindirim sisteminde bulunan ve faydalı olarak nitelendirilen bu mikroorganizmalara probiyotik adı verilir. Ve bunların gıdaların sindirimine, vitamin üretimine ve zararlı mikroorganizmaların neden olduğu hastalıkların önlenmesine yardımcı olduğu bilinmektedir (1, 2, 3, 4, 5).

Bağırsak ekosistemi fizyolojik dengesi hastalık, yaşlılık, antibiyotik veya ilaç kullanımı, diyet alışkanlıklarının değiştirilmesi, iklim koşullarında meydana gelen değişimler ve çevresel toksik maddeler gibi faktörlerden doğrudan veya dolaylı olarak etkilenebilmektedir (3). Bağırsak sisteminin dengesinde meydana gelen bu düzensizlikler sonucu bağırsak mikroflorasının dengesi bozulur ve faydalı mikroorganizma sayısında düşüşler başlar (6, 7).

Son yıllarda yapılan çalışmalara göre, bu mikroflora dengesizliğinin dışarıdan yapılacak mikroorganizma takviyesi ile aşılabileceği belirtilmiştir. Faydalı bakteriler yoğurt gibi fermente süt ürünlerine eklenerek, probiyotik ürün olarak piyasaya sunulmaktadır (2, 3).

Dışarıdan vücuda verilen bu yararlı mikroorganizmaların faydalı olabilmesi için midedeki düşük asitlik ve safra tuzu gibi öldürücü etkiler karşısında canlılıklarını muhafaza edebilmelidirler (8, 9).

Sonuçta faydalı mikroorganizma bağırsağa ulaştığında canlı ve belli bir sayının üzerinde olmalıdır (8, 9).

İmmobilizasyon (tutuklama) uzun yıllardır kullanılmakta olan bir yöntemdir. Bu yöntemde göre enzimler ve hücreler polimer adı verilen matrikslerin içerisine hapsedilmektedir. Bu yöntemin probiyotik mikroorganizmalara uygulanması ise yenidir (8, 9).

İmmobilizasyon ile probiyotiklerin hidrokolloid küreler içerisine hapsedilmesi bu mikroorganizmaların sindirim sistemi ve fermente gıdalarda canlılıklarının korunması için önerilen bir yöntemdir. Bu sayede koruyucu bir polimer tarafından sarılan

¹ Yüksek Lisans Öğrencisi, Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı Beşevler Ankara

² Doç. Dr., Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı Beşevler Ankara. Yazışmalardan sorumlu yazar, e-posta: baslim@gazi.edu.tr

mikroorganizmanın düşük asitlik, safra tuzu, bakteriyofaj gibi olumsuz etkilere karşı canlılığı korunmuş ve dayanıklılığı artırılmış olmaktadır. Ayrıca bu sayede ürünlerin depolanma süresi artmaktadır (7, 8, 9, 10).

Probiyotik

Tanımı ve Tarihçesi

Probiyotik kelimesi Yunanca olup “yaşam için” anlamına gelmektedir. Probiyotik terimi ilk defa 1965 yılında, Lilly ve Stillwell araştırmacılar tarafından, diğer mikroorganizmaların gelişimini destekleyen maddeleri tanımlamak için kullanılmıştır (3). Genel anlamıyla probiyotikler, insan ve hayvanların doğal mikroflorasına ait özellikleri geliştiren, tüketimleri sonucunda ağızda, sindirim sisteminde, üst solunum yollarında yada ürogenital kanallarda yararlı etkileri ile konakçının sağlığını koruyan, buralarda oluşan enfeksiyonların iyileşmesine katkıda bulunan, tek veya karışık mikroorganizma kültürleridir (4).

“Probiyotik ürün” denildiğinde ise; içerisinde konakçı sağlığı üzerine olumlu etkileri olan mikroorganizmaları içeren, çeşitli enzim, vitamin ve aroma bileşenleri ile desteklenerek doğrudan kapsül veya tablet haline getirilmiş diyet destekleyiciler anlaşılmaktadır. Bu tablet veya kapsüller “farmasötikaller” olarak da bilinmekte olup, hastalıkların tedavisinde ilaç yerine kesinlikle kullanılmamakta, sadece sağlık destekleyici ürünler olarak satılmaktadır (1, 2, 3).

Fermente gıdaların metabolizma üzerindeki faydalı etkileri ilk defa 20. yüzyılın başlarında, Nobel Ödülü sahibi, Rus bilim adamı Elie Metchnikoff tarafından öne sürülmüştür. Metchnikoff, Bulgar çiftçilerin fermente süt ürünleri tüketimi sonucu daha sağlıklı ve uzun ömürlü olduklarını, bunun nedeninin ise bu ürünlerde bulunan çubuk şeklindeki bakterilerin (*Lactobacillus* spp.) bağırsaktaki mikroflorayı olumlu yönde etkilemesi ve toksik mikrobiyal aktiviteyi azaltması olduğunu belirtmiştir. Fermente gıdalarda sağlıklı yaşam arasındaki bu bağlantı bugünde geçerliliğini korumaktadır. Fermente ürünler üzerine yapılan çalışmalar ancak son 10–15 yılda hız kazanmıştır (3).

Probiyotiklerin İnsan Sağlığı Üzerine Etkisi

Probiyotiklerin bağırsak fizyolojisi üzerine dolaylı veya doğrudan etkide bulunarak immun sistemi uyardığı, bu çerçevede konakçının ağız ve sindirim sistemi dahil, üst solunum yolu ve ürogenital sistem mukozal yüzeyini etkileyerek iyi hal ve sağlığı geliştirici, hastalık riskini azaltıcı potansiyel etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Aşağıda, probiyotiklerin zararlı etkilerini azalttığı hastalıklar ile güçlenmesine yardımcı olduğu sistemler üzerine etkisi hakkında bilgiler verilmiştir (2, 3).

Akut diyare (ishal): Çevre koşullarının genellikle yetersiz olduğu gelişmekte olan ülkelerde bebek ve çocuklarda diyare ataklarına rastlanır. Bu diyare ataklarının çoğu hafif geçer, ama bazıları yaşamı tehdit edecek kadar ağırdır. Bu bölgelerde, diyare ile seyreden hastalıkların büyük çoğunluğundan enterotoksijenik *E.coli* ve *Rotavirüs* birlikte sorumludur. Endüstrileşmiş ülkelerde ise bebekler ve çocuklarda diyare ataklarına daha az rastlanmaktadır. Ancak en sık görülen sorumlu etken yine

Rotavirüs'dür. Fermente süt ürünlerinin *Rotavirüs* diyareli çocuklarda diyarenin süresini yarı yarıya azalttığı bildirilmiştir (3, 11, 12, 13).

Antibiyotik kullanımı sonucu oluşan diyare: Antibiyotiğe bağlı diyarede; bağırsak mikroflorasındaki bir kısım faydalı mikroorganizmanın ölmesi sonucu zararlı mikroorganizmalar baskın hale gelir. Bu nedenle antibiyotik tedavisinin genellikle sindirim sistemi sisteminde bazı yan etkilere neden olduğu, antibiyotik alan hastaların %<20 sinde diyare olduğu bildirilmektedir. Bunun yanı sıra antibiyotik kullanımı sonrası hastada antibiyotiğe bağlı diyarenin oluşup oluşmayacağı önceden bilinmemektedir.

Antibiyotik kaynaklı diyarenin önlenmesi için birçok probiyotik kullanılmıştır. Bunlardan bazıları *Saccharomyces*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Streptococcus* dir. Bu uygulamalar sonucunda diyare süresinin kısaldığı ve hatta bazı suşların kullanılmasıyla önlendiği belirlenmiştir (3, 11, 13).

***Helicobacter pylori* enfeksiyonları:** Son zamanlarda kronik gastrit, mide ve onikiparmak bağırsağı ülseri hatta mide kanserinin önemli etkenlerinden birinin bu bakteri olduğu belirlenmiştir. Gram pozitif, mikroaerofilik bir mikroorganizmadır. Midede mukus tabakası veya hemen altında gastrik epitele yapışık halde bulunur. Bakteri salgıladığı üreaz enzimi ile çevresinde alkali bir ortam yaratarak mide asitinden, katalaz enzimiyle de nötrofillerden salınan reaktif metabolitlerin toksik etkisinden korunmaktadır. Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda bazı laktik asit bakterilerinin *H. pylori* 'ye antogonistik etki yaptığı rapor edilmiştir. Özellikle *Lactobacillus* cinsi türlerinde üretilen laktik asit ve bakteriosin gibi metabolitlere bağlı olarak *H. pylori* 'nin üreaz aktivitesinin önemli derecede azaldığı belirlenmiştir (2, 3, 14, 15).

Hepatik ensefalepati: Barsaklarda azotlu bileşiklerin amino asit deaminasyonu ve bakteriyel hidrolizi ile oluşan amonyağın, hepatik ensefalopati patogenezinde önemli rol oynadığı kabul edilmektedir. *Lactobacillus acidophilus* ve neomisin ile tedavi edilen hastalarda sadece neomisin ile tedavi edilen hastalara kıyasla fekal üreaz aktivitesinin daha fazla azaldığı belirlenmiştir. Fekal üreaz aktivitesinin azalması; serum amonyak düzeyini düşürerek hastanın klinik durumunun düzelmesine yol açmaktadır (2, 3, 5).

Laktoz intoleransı: Laktoz intoleransı, dünya nüfusunun %70'inde barsakta β -galaktosidaz aktivitesinin azlığından kaynaklanan bir problemdir. Glikoz ve galaktoz olarak bilinen iki monosakkaritten oluşan laktoz sütün karbonhidratı olup kolayca metabolize edilemez. Laktoz, β - D-galaktosidaz tarafından monosakkaritlere parçalandığı için, bu enzimin eksikliğinde laktoz parçalanamaz. Fermente olmayan süt ve ürünlerini tüketiminden sonra laktozun iyi metabolize edilmemesi sonucu sindirim bozuklukları meydana gelir.

Yoğurt yapımında kullanılan *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* 'dan oluşan geleneksel kültürler önemli miktarda β - D-galaktosidaz enzimi içerdikleri için, yoğurt tüketimi laktozun metabolize edilememesine bağlı bağırsak hastalıklarını azaltmaktadır. Yoğurt ve probiyotik yoğurtla yapılan çalışmalarda laktoz emilimi iyi tolere edilmiştir. Sütteki laktozun bir kısmı yoğurt bakterileri tarafından fermentasyon sırasında parçalanmaktadır (2, 3).

Serum kolestrolünün düşürülmesi: Bazı kan lipidlerinin yüksek düzeyleri kalp-damar hastalıklar açısından risk faktörüdür. Birçok araştırmacı laktik kültür içeren süt ürünleri ve probiyotiklerin kolestrol düşürücü etkileri olduğunu bildirmiştir. 1974'den bu güne fermente süt ürünleri tüketiminin kan lipidleri üzerindeki etkisini değerlendiren ve toplam 534 denek ile yapılan çalışmalar sonucunda, kolestrol düşürücü etki istatistiksel olarak önemli bulunmuş, toplam kolestrolde % 2,4-23,2 ve düşük dansiteli lipoprotein (LDL) kolestrolünde ise %9,0-9,8 oranlarında azalma tespit edilmiştir. Probiyotik bakterilerin serum kolestrolünü düşürücü etkileri ve mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Bu konu ile ilgili değişik hipotezler öne sürülmüştür (2, 3, 16, 17, 18).

Kanser: İnsanlarda görülen kanserlerin nedeni %80-90 oranında çevresel faktörlerden kaynaklanmaktadır. Karsinojen maddeler vücut dışında üretilmekte ve ön karsinojen maddeler olarak alındıktan sonra kanser etmeni bileşiklere dönüşmektedir. Bağırsak sisteminde bulunan karsinojenlerin inaktivasyonunda, yayılmasında ve özellikle nitrozaminlerin ve safra sterollerin kanser etmeni maddelere dönüşmesinde önemli rol oynarlar. Probiyotiklerin kanser oluşumunu riskini azalttığı birçok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur. Örneğin Aso ve Akanzan (36), çalışmalarında 10^{10} kob/g düzeyinde *L. casei* toz preparatından bir yıl boyunca günde üç defa tüketen insanlarda mesane kanseri tedavisi sürecinin hızlandırıldığını tespit etmişlerdir. Bir başka çalışmada ise *L. acidophilus* tüketiminin kalınbağırsak kanserini önlediği tespit edilmiştir. Bu çalışmaya 21 adet sağlıklı bireylerden gönüllüler katılmış ve *L. acidophilus* kültürü süt veya yoğurda katılarak deneklere verilmiştir. Araştırmacılar bir aylık uygulama periyodundan sonra dışkıdaki prokarsinojenleri karsinojene dönüştüren bakteriyel enzim konsantrasyonunda önemli azalmalar olduğunu bildirmişlerdir (2, 3, 5, 13, 19, 20).

Hipertansiyon: Yaşlı hipertansif bireyler üzerinde yapılan çalışmalarda 8 hafta süreyle fermente edilmiş süt tüketiminin sistolik ve diastolik kan basıncını önemli derecede azalttığı bildirilmiştir. Bu ve benzeri çalışmalar sonucu probiyotik bakterilerin hipertansiyonu düşürmek için alternatif bir yaklaşım olabileceği belirlenmiştir (3)

İmmün sistemin düzenlenmesi: Probiyotik bakterilerin endojen savunma mekanizmasının arttırdığı ileri sürülmektedir. Probiyotiklerin barsaklarda özgül olmayan savunma bariyerini uyarıcı etkisi, artan intestinal permeabiliteyi normale dönüştürmesi ve barsak mikroflorasını değiştirmesi ile açıklanmaktadır. Ayrıca bu etkinin intestinal immünoglobulin A (IgA) yanıtını arttırması ve intestinal inflamatuvar yanıtı hafifletmesi ile ilgili olabileceği belirtilmektedir. Probiyotiklerin bu etkinliklerini fagositik aktivite, sitokin salınımı, doğal öldürücü hücre aktivitesi, immünoglobulin aktivitesi (Ig A, IgG, IgM), T ve B hücre fonksiyonunu arttırarak gösterdiği ileri sürülmektedir.

Probiyotiklerin bu aktivitesinin alerjik duyarlılığı olan bireyler içinde önemli olduğu vurgulanmıştır. Yapılan çalışmalarda probiyotik bakterilerin sağlıklı ve alerjik bireylerde farklı fagositik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Sağlıklı bireylerde immün sistemi uyarıcı etki, alerjik bireylerde inflamatuvar yanıtı azaltıcı etki yapmaktadır. Bu veriler gastroenterit, besin alerjisi ve inflamatuvar barsak hastalıkları gibi barsak

mukoza bariyerindeki bozukluklarda probiyotiklerin kullanılabilceğini göstermektedir (2, 3, 5, 21).

Probiyotiklerin insan sağlığı üzerine yararlı etkileri ve bu etkilerin mekanizması kısaca çizelge 1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1. Probiyotiklerin potansiyel etki mekanizmalarının temeli (3).

Yararlı etki	Etkinin mekanizması
Laktoz sindirimine katkı	Bakteriyel laktaz ile laktozun sindirimi
Enterik patojenlere karşı direnç	Bağıışıklık salgılama etkisi, Kolonizasyon direnci İntestinal sistemin patojenleri için uygun olmayan koşullara değişimi (pH, kısa zincirli yağ asitleri ve bakteriyosinler), Toksin bağlama bölgelerinin yapısal değişimi, İntestinal flora populasyonları üzerindeki etki, İntestinal mukozada agregasyon oluşturarak patojenlerin bağlanması engelleme, İntestinal mün üretimini düzenleyerek patojenleri epitel hücrelere tutunmasını önlemek
Bağırsak kanserini önleyici etki	Mutajenleri bağlama, Karsinogenlerin aktivitesini engelleme, Bağırsak mikroorganizmalarının ürettiği kasinogen üreten enzimlerin inhibisyonu, Bağıışıklık sistemini güçlendirme, İkincil safra tuzu konsantrasyonunu etkileme
İmmün sisteminin düzenlenmesi	Enfeksiyon ve tümör oluşumuna karşı spesifik olmayan savunma mekanizmasını güçlendirir. Antijene özgü immün yanıtı yardımcı etki, IgA üretimini artırılması
Alerji	Antijen etkiye sahip maddelerin dolaşım sistemine geçişinin engellenmesi
Kan lipidleri ve kalp hastalıkları	Kolesterolün bakteri hücresi içinde asimilasyonu, Safra tuzu hidrolazın dekonjugasyonu ile safra tuzlarının atılımını arttırmak, Antioksidasyon etkisi
Hipertansiyonu önleyici etkisi	Peptidazın süt proteinleri üzerine etkisi sonucu oluşan tripeptidler angiotensin1 enzim dönüşümünü inhibe etmesi, Hücre duvarı komponentlerinin angiotensin 1 enzim inhibitörleri gibi davranması
Ürogenital enfeksiyonlar	Ürinar ve vajinal bölge hücrelerine adhesyon, Bölgeye güçlü kolonize olabilme, İnhibitör üretimi (H ₂ O ₂ , biyosüfaktant)
<i>Helicobacter pylori</i> 'nin neden olduğu enfeksiyonlar	<i>H. pylori</i> inhibitörlerinin (laktik asit, bakteriosin v.b.) üretimi
Hepatik ensefalopati	Üreaz üreten bağırsak florasının inhibisyonu

Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar

Genel olarak probiyotik kapsamına giren mikroorganizmalar bakteri veya maya hücreleri olarak iki gruba ayrılır. Bunlardan insanlar için kullanılanlar *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum*, *B. infantis*, *Streptococcus thermophilus* ve *Saccharomyces boulardii*, hayvanlar için kullanılanlar ise *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum*, *B. infantis*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus mesentericus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *Pediococcus pentosaceus*,

Aspergillus oryzae, *Saccharomyces cerevisiae* olarak gruplandırılmaktadır. Bunlar arasında *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* dışında tümü insan mikroflorası elemanıdır. Probiyotik bir üründe pek çok bakteri türü ve bunların suşları bulunabilir. Probiyotik olarak kullanılan *Bacillus subtilis* (22) ve *Pediococcus* sp. (23) 'nin mikroskopik görüntüleri için tıklayın.

Probiyotik Mikroorganizma Seçim Kriterleri

Bir mikroorganizmanın probiyotik olabilmesi için belirli kriterlere sahip olması gerekmektedir. Bu kriterler;

-İnsanların kullanımına yönelik hazırlanan ürünlerde kullanılan mikroorganizmalar, insanlardan izole edilmiş suşlardan seçilmelidir. Kullanılan suşlar, gelişmiş teknikler kullanılarak tanımlanmış güvenilir suşlar olmalıdır.

-Mide – bağırsak sisteminde probiyotik etkinin oluşabilmesi için kullanılan suşlar mide asitliğine ve safra tuzlarına karşı dirençli olmalıdır. Bu özellikle ağızdan yapılan uygulamalarda mikroorganizmanın canlı kalması, metabolik aktivitesini devam ettirebilmesi ve tutunabilmesi açısından önemlidir.

-Patojenlerle yarışmalı rekabet sonucu probiyotik suşların bağırsak epiteline patojenlerden önce tutunabilmesi veya agregasyon oluşturabilmesi gerekmektedir.

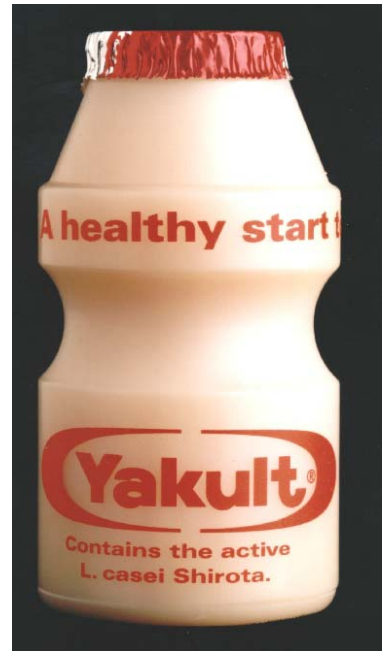
-Kullanılan suşun teknolojik özelliklerinin probiyotik ürün üretimine uygun olması gerekmektedir. Şöyleki: büyük ölçekte üretime uygun, istenmeyen aroma bileşikleri üretmeyen, fajlara karşı dirençli suşlar probiyotik üretiminde başarı ile kullanılabilir.

Ticari Probiyotik Ürünler

İnsan tüketimi için hazırlanmış çok fazla sayıda ticari probiyotik preparatı bulunmaktadır. Bunlardan birçoğu farmasötikler olarak, kapsül, toz, tablet veya sıvı formda satışa sunulmaktadır. *Lactobacillus casei* Shitota suşu ticari olarak satışa sunulanlardan en eskisi olup, 1930 yılında Japonya'da izole edilmiştir. Bu suşu içeren probiyotik ürün Şekil 1'de görülmektedir.

Günümüzde satılan probiyotiklerin birçoğu daha önce belirttiğimiz kriterler kullanılarak seçilmiştir. Sağlık açısından faydalı etkileri ölçülebilen ve fonksiyonel özellikleri olan probiyotik suşlar elde etmek için bu kriterlere sahip suşların seçilmesi gerekmektedir. Özellikle canlılık kaybı ticari probiyotik üretiminde karşılaşılan en önemli sorunlardan birisidir.

Canlılık kaybının sebebi, probiyotiklerin üretim yöntemleri ve muhafaza koşulları ile ilgilidir.



Şekil 1 Probiyotik fermente sütlü içecek (11)

Yapılan bir çalışmada kullanılan ticari ürünlerden biri, liyofilizasyon yöntemi ile toz forma getirilmiş ve bu ürünün, buzdolabında korunması önerilirken, hiçbir mikroorganizma izole edilemeyen başka bir ürünün oda sıcaklığında satışa sunulması ve açıldıktan sonra buzdolabında korunması önerilmiştir. Bu farklı satış ve muhafaza koşulları üründeki canlı mikroorganizma sayısını etkileyebilmektedir.

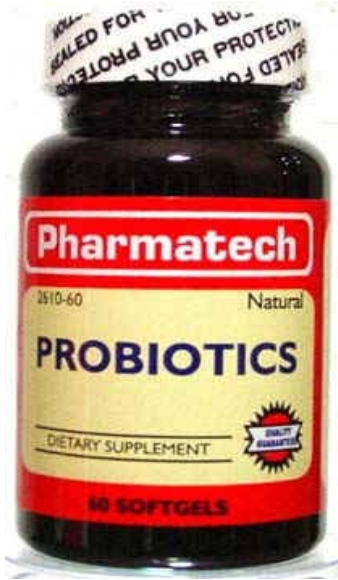
Canlılık kaybının bir diğer etmeni ise ürünün bileşimine katılan mikroorganizma dışındaki mineral, vitamin, aroma maddeleri vb. gibi katkılarıdır. Bu maddeler üründeki florayı önemli ölçüde değiştirebilmekte, etikette belirtilen türlerin canlılığını yitirmesine neden olmaktadır.

Kısaca, probiyotik üretiminde kullanılacak mikroorganizmaların metabolik ve teknolojik özellikleri işlenecek ürünün prosesine uygun olmalı ve son üründeki canlı mikroorganizma sayısı istenilen düzeyde kalabilmelidir (3, 7, 10). Probiyotik mikroorganizmaların fizyolojik etkileri üzerinde yapılan araştırmalar diyare, laktoz intoleransı ve kolon kanserini önleyici etki için gerekli dozun 10^9 – 10^{10} kob/gün olduğunu göstermiştir (3, 24). Uluslararası Sütçülük Federasyonuna göre günlük bu oran 10^7 kob/g canlı hücre olarak belirlenmiştir. Yani probiyotik ürünler, en az belirtilen oranda canlı bakteri içermelidir (7).

Bazı probiyotik preparatlar ve bunlara ait ticari bilgiler çizelge 3’de verilmiştir. Ayrıca şekil 2 ve 3’de bu preparatlardan yaygın olan ikisi görülmektedir.

Çizelge 3 Ticari probiyotik preparatları ve bunlar hakkında bazı bilgiler (3).

Ürün adı	Üretici firma	Etkin mikroorganizma	Ürün formu	Ülke
Yakult 65	Yakult Honsha	<i>L. casei</i>	Fermente sütlü içecek	Japonya
Sofuhl	Yakult Honsha	<i>L. casei</i> <i>S. thermophilus</i>	Fermente süt	Japonya
Vitagen	Malaysia Dairy Industry	<i>L. acidophilus</i>	Fermente sütlü içecek	Malezya, Singapur
LC1	Nestle	<i>S. thermophilus</i> <i>L. bulgaricus</i>	Yoğurt, fermente süt	Türkiye, AB ülkeleri
Probiotica	MacNeil-PPC	<i>L. reuteri</i>	Kapsül	ABD



Şekil 2 Probiyotik kapsül (25)



Şekil 3 Probiyotik yoğurt (26)

İmmobilizasyon

İmmobilizasyon; suda çözünen ve çözeltide serbest hareket edebilen enzim moleküllerinin suda çözünmeyen reaktif polimerik destek materyaller kullanılarak hareketlerinin sınırlandırılmasına denir (28).

İmmobilize olmuş enzimlerde, enzimin hareketleri sınırlandırılmış ve belli bir desteğe veya polimerik matris'te alıkonularak tekrar tekrar katalitik aktivite göstermesi amaçlanmıştır. İmmobilizasyon uygulamaları sadece enzimlere değil ayrıca hücresel organellere, mikrobiyal hücrelere, bitki hücrelerine ve hayvan hücrelerine v.b. uygulanabilir (27, 28).

İmmobilize enzimlerin ilk endüstriyel uygulaması 1969 yılında Chibata tarafından gerçekleştirilmiştir ve yine ilk olarak hücre immobilizasyonu Chibata ve çalışma arkadaşlarınca 1973 yılında yüksek seviyede aspartaz aktivitesine sahip *E. coli* 'yi poliakrilamid jelinde hapsetmişlerdir (27).

Son 20–30 yılda enzim immobilizasyonunun yanında mikroorganizma immobilizasyonu da önem kazanmıştır. Substrat, mikroorganizmanın içerdiği enzimlerden biri için spesifik ise saf bir enzimin immobilizasyonu yerine bunu içeren mikroorganizmanın immobilizasyonu ve saflaştırılmasına gerek kalmayacağından ekonomik açıdan büyük yarar sağlamaktadır. Özellikle son ürün elde edebilmek için birden fazla enzimden yararlanılıyor ve problem yaratmıyor ise enzim yerine mikroorganizma immobilizasyonu çok ekonomiktir (27).

İmmobilize enzimin doğal (serbest) enzime üstünlükleri;

-Tepkime sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme vb.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.

-Çevre şartlarına (pH, sıcaklık vs.) karşı daha dayanıklıdır.

-Bir çok kez ve uzun bir süre kullanılabilir.

-Sürekli işlemlere uygulanabilir.

-Doğal enzime göre daha kararlıdır.

-Ürün oluşumu kontrol altına alınabilir.

-Birbirini izleyen çok adımlı tepkimeler için uygundur.

-Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktive gösterebilir.

-Enzimin kendi kendini parçalaması olasılığı azdır.

-Mekanistik çalışmalar için uygundur.

Enzim immobilizasyonun en büyük dezavantajı enzim aktivitesinin %100'lerde olmayıp %50-60'larda olmasıdır (27, 28, 30, 31).

Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Kelime anlamı olarak immobilizasyon, hareketi sınırlandırma demektir. İmmobilize edilen enzimlerin gerçekten hareketleri sınırlandırılmış olmaktadır. İmmobilize enzim çerçeve bir isim olup 'tutuklanmış', 'çözünmez hale getirilmiş', 'bağlanmış' gibi terimleri kapsamaktadır.

İmmobilizasyon yöntemler enzimler için kullanıldığı gibi mikroorganizma hücrelerini tutuklamak için de kullanılabilir. Bugün 100'ün üzerinde immobilizasyon tekniği geliştirilmiştir

Bunlar;

-Fiziksel adsorpsiyon

-İyonik bağlanma

-Kovalent bağlanma

-Hapsetme (Entrapment)

-Mikrokapsülleme

Önemli enzim immobilizasyon yöntemleri aşağıda gösterilmiştir (27, 29, 30).

A) Bağlama

1) Taşıyıcıya Bağlama

a) Kovalent Bağlama

b) İyonik Bağlama

c) Adsorbtif Bağlama

2) Çapraz Bağlama

a) Homo-çapraz Bağlama

b) Ko-çapraz Bağlama

B) Tutuklama

- 1) Matrikste Tutuklama
 - a) Çapraz Bağlı Polimerde
 - b) Sertleşebilen Jelde
- 2) Membranda Tutuklama
 - a) Mikrokapsülleme
 - b) Membran Reaktörleri

Taşıyıcı (Destek Materyali)

immobilizasyonda doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Taşıyıcı membran, suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir. İmmobilizasyonda kullanılan taşıyıcılarda (destek materyallerde) çeşitli özellikler aranır. Bunlar; Hidrofilik karakter; Suda çözünmeme; Gözenekli (poröz) yapı; Mekanik stabilite ve uygun parçacık formu; Kimyasal veya termal kararlılık; Kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcılar yumuşak koşullarda tepkime verebilen gruplar taşımali; Mikroorganizmalara karşı dirençlilik; Ucuzluk; Zehirsizlik; Rejenere olabilmelidir (27, 28).

Özellikle hücreleri tutuklamak için seçilen polimerde aranacak özellikler şunlardır: Jel oluşturacak polimer çözeltisi hücre süspansiyonu ile kolayca karışabilmelidir; Hücrelerin canlılığını korumak için, zehirleyici maddelerin bulunmadığı ılımlı bir ortamda jel oluşturulmalıdır; Jel, fermentasyon şartlarında mekanik kararlılığını korumalı ve toksik olmamalıdır; Toplam maliyeti düşük olmalıdır; Gözenek çapı, substratın içeri girmesine, ürünlerin dışarı çıkmasına yetecek kadar geniş ve hücrelerin destek içinde kalmasını sağlayacak kadar dar olmalıdır (27, 32).

Bu özellikleri içeren destek polimerlerine şu örnekleri verebiliriz

Carrageenan: Kırmızı alglerin hücre duvarlarından elde edilen başka bir polisakkarittir. Heterojenik bir polisakkarit olup çoğunluğunu D-galactopyranosyl sülfat esterleri oluşturur. Hücre immobilizasyonunda yeni yeni kullanılmaya başlanan bir polimerdir (27, 33).

Alginatlar: Alginat türevleri ve alginik asit, kahverengi alglerin hücre duvarlarından ekstraksiyon sonucu elde edilen bir karbonhidrattır. Hücre immobilizasyonunda çok sık kullanılır. Ucuz ve kullanımı kolaydır. Asitliğe çok dirençli değildir (4, 27, 33).

Xanthan: Xanthan gum bir heteropolimer olup oluşumunda glukoz, mannoz ve glukuronik asit yapıları rol oynar. Bu polimer bitki patojeni olan (ilk defa Rutabaga bitkisinden izole edilmiş) *Xanthomonas campestris* tarafından üretilmektedir. Özellikle probiyotik bakterilerin immobilizasyonunda gellan gumla beraber kullanılır. Bu iki polimer karışımı asitliğe ve Ca iyonlarına karşı dirençlidir (27, 33, 34).

Bu polimerler tek başlarına kullanılabileceği gibi gellan-xanthan, alginat-nişasta gibi karışımlarla da kullanılmaktadır. Bu karışımlarla polimerin yüksek asitlik veya bazlık gibi olumsuzluklarda bozunmadan kalabilme süresinin artırılması hedeflenmektedir (4).

İmmobilizasyonunda Kullanılan Metotlar

Hücre immobilizasyonu için bir hayli metot vardır. Bunlar enzimler için geliştirilmiş tekniklerdir. Buna rağmen enzim immobilizasyonunda kullanılan metotların tamamı hücreler için kullanılmaz. Enzim immobilizasyonunun iki genel tipi mikroorganizmalar için de kullanılır. Bunlar, desteğe tutturma ve hapsetmedir. Bunlardan en çok tercih edilen teknik ise hapsetme metodudur (27).

A) Tutturma

- 1) Desteksiz: Birikme (Agregasyon) ya da çapraz bağlayıcılar ile çökeltme
- 2) Destekli:
 - a) Kovalent bağlanma
 - b) İyon değiştiricilere yada inorganik biyofilmlere adsorpsiyon.

B) Hapsetme

- 1) Organik polimerlere
- 2) İnorganik polimerlere
- 3) Yarı geçirgen zarlara

Tutturma

1. Desteksiz immobilizasyon:

Bazı organizmalar örneğin; mayalar birikme eğilimi gösterirler. Çevresel koşullar organizmaları birikmeye iterler. Fungus ve bakteri sporlarında bu olay görünür. Organizmaların hücre duvarları serbest amino ve/veya karboksil grupları içerirler. Glutaraldehit, benzidimin, triklor-s-triazin, hekzametilendiizosiyanat gibi çapraz bağlayıcı kullanılarak hücre duvarındaki fonksiyonel gruplarla bir çapraz örgü oluşturularak birikme sağlanabilir (28, 30)

2. Destekli immobilizasyon:

a) Kovalent bağlanma: Çeşitli taşıyıcılara hücrelerin kovalent bağ ile bağlanmasında glutaraldehit ve başka çapraz bağlayıcılar kullanılır. Çapraz bağlayıcı ile hücre ve destek bir arada tutularak immobilizasyon sağlanabilir (27, 28).

b) Adsorpsiyon: Bir hayli mikroorganizma katı yüzeye yapışma yeteneğine sahiptir. Bu özellik kullanılarak çeşitli destek materyallere mikroorganizmalar immobilize edilebilir. Bazı memeli hücreleri bu şekilde; polisitirene, kollojene, agaroz ve selüloza bağlanırlar (28, 31, 32, 34)

Hapsetme

Bu yöntem polimer jeller içinde hapsetme diyebiliriz. Mikroorganizmaların üç boyutlu polimerik ağ içinde hapsedilmesi çok popüler bir metottur Hücre etrafında polimer ile bir örgü oluşturulur. Oluşan örgünün gözenekleri, hücre molekülünden küçük, substrat ve ürün moleküllerinden büyüktür. Bu yüzden hücreler bağ ile bağlı olmadıkları halde dışarı çıkamazlar adeta bu oluklarda hapsolurlar hücrenin hareketi kısıtlanır; ancak substratın içeri girişi ve ürünün dışarı çıkışı mümkündür. Çeşitli enzim ve hatta mikroorganizmalarda bu şekilde tutuklanabilmektedirler. Çeşitli hücrelerin hapsedilmesinde kullanılan polimerler; poliakrilamid, poliüretan, jelatin, agaroz, alginat v.b. organik veya inorganik maddelerdir.

Bu yöntemde hücre çok değişik boyutlarda yarı geçirgen zarlı yapay hücreler (mikrokapsüller) içinde de hapsedilmektedir. Mikrokapsüller içlerindeki maddeleri dışarı geçirmemekte ancak substratın içeri girişi ve ürünün dışarı çıkışı çok kolay olmaktadır.

Mikrokapsüllerden, çözelti veya süspansiyon halindeki enzim veya proteinlerden başka, hücre özütleri, bakteriler, radyoaktif işaretli veya manyetik özellikte maddeler, kofaktörleride içeren karmaşık enzim sistemleri, kontrollü ilaç salınım sistemleri, adsorban granülleri de tutuklama konusunda kullanılmışlardır. Kapsüllemeye kullanılan zarlar, sentetik veya biyolojik olabilir. Sentetik zarlar; selüloz nitrat, selüloz asetat, naylon, poliüretan olabilir. Biyolojik zarlar canlı sistemde parçalanabilen yapıdadır. Bu gruptaki zarlar protein, lipoprotein, lipit, poliakrilik asit, alginik asit gibi maddelerden oluşabilir.

Bu tarzda tutuklanmış enzimlerin vücutta immunolojik reaksiyonlara neden olmaması, sağlığa zararlı olmaması, vücuda verildiğinde de aktivitesinde azalma olmaması gereklidir. Genel olarak tutuklama enzimatik aktiviteyi %10–50 azaltır. Ancak uzun süre kullanımda bu önemli bir sorun olmaz (27, 30, 31, 34).

Hapsetme tekniği ile immobilize olmuş hücrelere ait görüntüleri için [tıklayın](#) (35).

Sonuç

Geçen 20 yıl boyunca probiyotikler insan sağlığı üzerindeki rolleri nedeniyle araştırmacıların dikkatini çekmiştir ve bu ilgi artarak devam etmektedir.

Özellikle dışarıdan alınan gıdalarla vücuttaki mikrobiyal dengenin korunması ve immün sistemin güçlendirilmesi ile ilgili araştırmalar hız kazanmıştır. Bu nedenle bazı fermente ürünler probiyotik mikroorganizmalarla zenginleştirilmiş ve insanların tüketimine sunulmuştur (7).

Probiyotik ürünler üzerinde yapılan çalışmalar sonucu her probiyotik ürünün istenilen düzeyde canlı bakteri içermediği ve bu bakterilerin probiyotikler için istenilen özelliklerin hepsine sahip olmadığı gözlenmiştir. Bir bakterinin probiyotik olabilmesi için sadece antimikrobiyal aktiviteye sahip olması, doğru tanımlanmış olması yeterli olmamaktadır. Ürün içerisinde canlılığını koruyabilme, asitlik ve safra tuzlarına karşı direnç, adhezyon yetenekleri de probiyotik seçimindeki önemli kriterlerdendir.

Probiyotik olarak satılan ticari suşlar ile potansiyel yerel suşların tek başlarına istenilen özelliklerin hepsini birden karşılayamadıkları belirlenmiştir. Immobilizasyon gibi teknikler kullanılarak probiyotik bakteri dış etkilerden muhafaza edilebilir. Immobilizasyon da kullanılacak bakteriye, ekleneceği ürüne göre polimer seçimi yapılmalı, polimerin hangi oranda kullanılacağı belirlenmeli, tutuklanan bakterinin polimer içerisinde ne kadar canlı kalabileceği araştırılmalıdır.

Bu konu ile ilgili çalışmalar, ticari olarak laktik asit üretiminin nasıl arttırılabileceği ile ilgili yöntemlerin denenmesi ile başladı. Bilindiği gibi Laktik asit bakterileri birincil metabolit olarak laktik asit üretir ve laktik asit endüstride birçok alanda kullanıma sahiptir. Özellikle immobilize laktik asit bakterilerinde laktik asit üretiminin artması ve

hücrelerin devamlı kullanılabilmesi bu yöntemin farklı alanlarda da uygulanabileceğini göstermiştir.

Probiyotik bakterilerin immobilizasyonu ile ilgili yapılan araştırmalar hızla devam etmektedir. Immobilizasyon sonrası bakteride istenilen özelliklerin korunup korunmadığı in vivo ve in vitro çalışmalarla tespit edilmektedir. Özellikle insan vücuduna zarar vermeyen, yüksek asitlik ve safra tuzlarına dirençli bakteriyi her türlü dış ortamdan koruyabilecek doğal polimerler çalışmalarda tercih edilmektedir. Immobilizasyon sonucu küçük kürelere hapsedilmiş bakteriler fermente süt ürünlerine katılmakta ve bu şekilde tüketime sunulmaktadır. Bunun ötesinde özellikle yoğurt starteri olan bakterilerin immobilize şekillerinin yoğurt yapımında kullanılabilirliği de araştırılmaktadır. Bu sayede bir veya iki bakteri ile istenilen kalitede probiyotik ürün elde edilmiş olacaktır.

Gen aktarımının çok yaygın olarak yapıldığı dünyada, insanların tercihi hep doğal ve genetik yapısına müdahale edilmemiş ürünlerden yana olmaktadır. Ülkemizdeki çok çeşitli doğal fermente ürünleri ile yeni probiyotik mikroorganizma türlerinin izolasyonunda zengin bir kaynaktır. Bu ürünlerden izole edilen probiyotik mikroorganizmaların kesin tanıları yapıp özellikleri belirlenerek daha kaliteli ve faydalı probiyotik ürünler topluma sunulabilir (3).

KAYNAKLAR

1. Çakır, İ., 2003, Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Gıda mikrobiyolojisi ders notları,1
2. Yücesan, S., 2002, Probiyotikler ve sağlık üzerine etkileri, Türk Diyetisyenler Derneği Bülteni. Sayı:2, 1-13
3. Çakır, İ. 2003, Lactobacillus ve Bifidobacterlerde bazı probiyotik özelliklerin incelenmesi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Ankara
4. Klaenhammer,R.T., Kullen, J.M., 1999, Selection and design of properties , Int. J. of Food Microbiol, 50, 45-57
5. Rolfe,R.D., 2000, The role of probiotic cultures in control of gastrointestinal health, J. of Nutrition, 130, 3965-4025
6. Krasaekoopt,W., Bhandari,B., Deeth, H., 2003, Evaluatin of encapsulation techniques of probiyotics for yoghurt, International Dairy Journal, 33, 3-13
7. Sultana,K., Godward,G., Reynolds,N., Arumugaswamy,R., Peiris,P., Kailasapathy,K., 2000, Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-strach and evaluation of survival in simulated gasrtointestinal conditions and in yoghurt, İnt.J.Food Microbiol.,62, 47-55
8. Lee ,K., Heo,T., 2000, Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution, App. and Environ. Microbiol., 66;2, 869-873
9. Trindade, F., Grosso,C., 2000, The effect of the immobilization of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in alginate on their tolerance to gastro-intestinal secretions, Milchwissenschaft, 55;9, 496-499
10. Sun, W., Griffiths, M., 2000, Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads, Int. Journal of Food Microbiol., 61, 17-
11. <http://www.keepfit.org.uk/yabs19.jpg>

12. Hove, H., Norgaard.H., Mortensen. PB., 1999, Lactic acid bacteria and the human gastrontestinal tract, Eur.J. Clin. Nutr., 53 ,339-50
13. Marteu, PR., Cellier. CJ., 2001, Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics, Am. J. Clin. Nutr.,73, 430-436
14. Lorca, G., Wadstrom, T., Vandez, G., Ljungh, A., 2001, *Lactobacillus acidophilus* autolysins inhibit *Helicobacter pylori* in vitro, Current Microbiol., 42, 39-44
15. Kim, T., Hur, j., Yu, M., Cheigh, C., Kim, K., 2003, Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteiocins of Lactic acid bacteria, J. of Food Protect. 66;1, 3-12
16. Taylor, G., Williams, C., 1998, Effect of probiotics and prebiotics on blood lipids, Brit. J. Nutr., 80, 225-230
17. Tahri, K., Grill, J. P., Schneider, F., 1996, Bifidobacteria strain behavior toward cholestrol: Coprecipitation with bile salts and assimilation, Curr.Microbiol., 33, 187-193
18. Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., Collins, J., 2000, Effect of conjugated bile salts on antibiotic susceptibility of bile-tolerant *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* isolated, J. Food Protect., 63;10, 1369-1376
19. Wollowski, I., Rechkemmer, G., Pool-Zobel, B., 2001, Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer , Am. J. Clin. Nutr, 73, 455-5
20. Aso, Y., Akazan, H., 1992, Prophylactic effect of a Lactobacillus casei preparation on the recurrence of superficial bladder cancer, Urol. Intl., 49, 125-129
21. İsolauri, E., Sutas, Y., Kankaapaa, P., 2001, Probiotics: effects on immunity, Am. J. Clin. Nutr.,73, 444-50
22. http://www.nature.com/genomics/images/subtilis_200.jpg
23. <http://distans.livstek.lth.se:2080/pedio.htm>
24. Sanders, M., 1999, Probiotics, Food Technology, 53, 67-77
25. <http://www.pharmatech-usa.com/probio5.jpg>
26. http://www.nestle.co.jp/new/2002/0206_7/lc1.jpg
27. Demirel, G., 2003, Tutuklanmış *Aspergillus niger* kullanılarak sitrik asit üretimi ve sitrik asit üretimi üzerine çeşitli etkilerin incelenmesi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara
28. Telefoncu, A., 1999, Enzim immobilizasyonu, Enzimoloji, Biyokimya lisansüstü yaz okulu, Kuşadası, Türkiye, 193-248, Ege Üniversitesi, Basımevi, İzmir.
29. Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M., 1993, Principles of biochemistry second ed., 468, USA.
30. Scragg, A. H., 1988, Biotechnology for engineers, John Wiley and Sons, 322-337, England.
31. Woodward, J.,1985, Immobilised cells and enzymes : a practical approach , 39-54, Oxford
32. Margaritis, A., and Merchant, F.J.A., 1984, Advences in ethanol production using immobilized cell systems, CRC Critical Review in Biotechnology, 1;4, 339-393.
33. <http://www.wws.princeton.edu/cgiin/byteserv.prl/~ota/disk1/1993/9313/931304.PDF> +
34. Kolot, F.B., 1980, New trends in yeast technology immobilized cells, Process Biochemistry, 2-9.
35. http://www.che.ccu.edu.tw/~bio/images/new_pa3.jpg +