

Effect of Using Whey Protein, Inulin and Cream on the Viability of Yogurt and Probiotic Bacteria in Probiotic Yogurts During Passage Through a Dynamic In Vitro Gastrointestinal Model

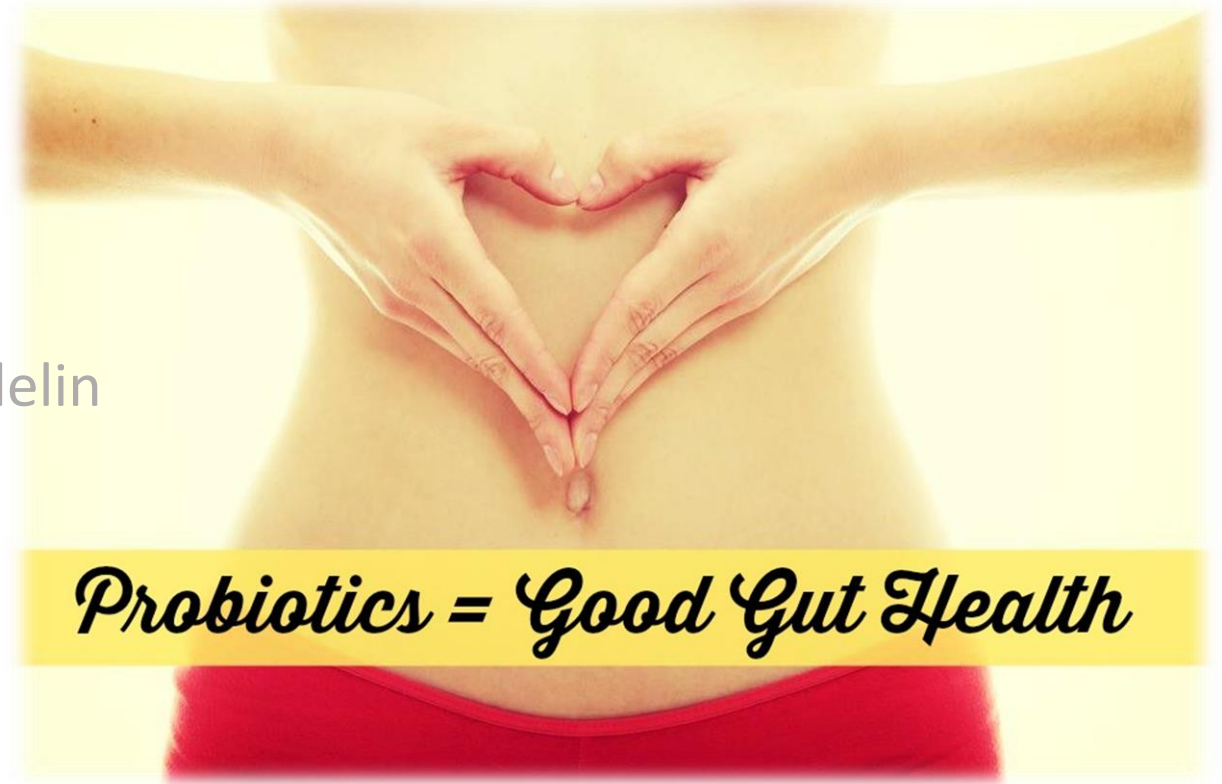
Dr. Öğretim Üyesi E. Mine ÇOMAK GÖÇER

Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü

Sunum içeriği

- **PROBİYOTİKLER**
- **SİNDİRİM SİSTEMİ**
 - **Gastrointestinal Modeller**
- **MATERYAL ve METOT**
 - **Probiyotik Yoğurt Üretimi**
 - **Dinamik *In Vitro* Gastrointestinal Modelin Oluşturulması**
- **BULGULAR ve TARTIŞMA**
- **SONUÇ**

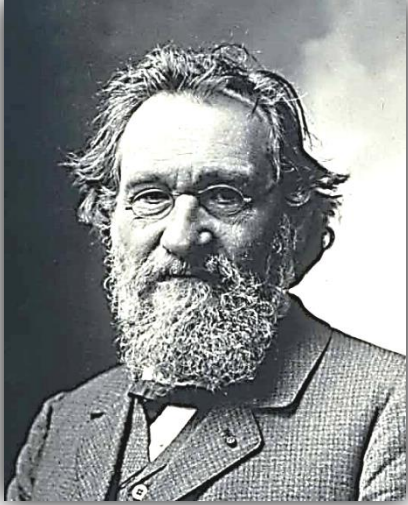
- **PROBİYOTİKLER**
- SİNDİRİM SİSTEMİ
 - Gastrointestinal Modeller
- MATERYAL ve METOT
 - Probiyotik Süt Ürünleri Üretimi
 - Dinamik *In Vitro* Gastrointestinal Modelin Oluşturulması
- BULGULAR ve TARTIŞMA
- SONUÇ



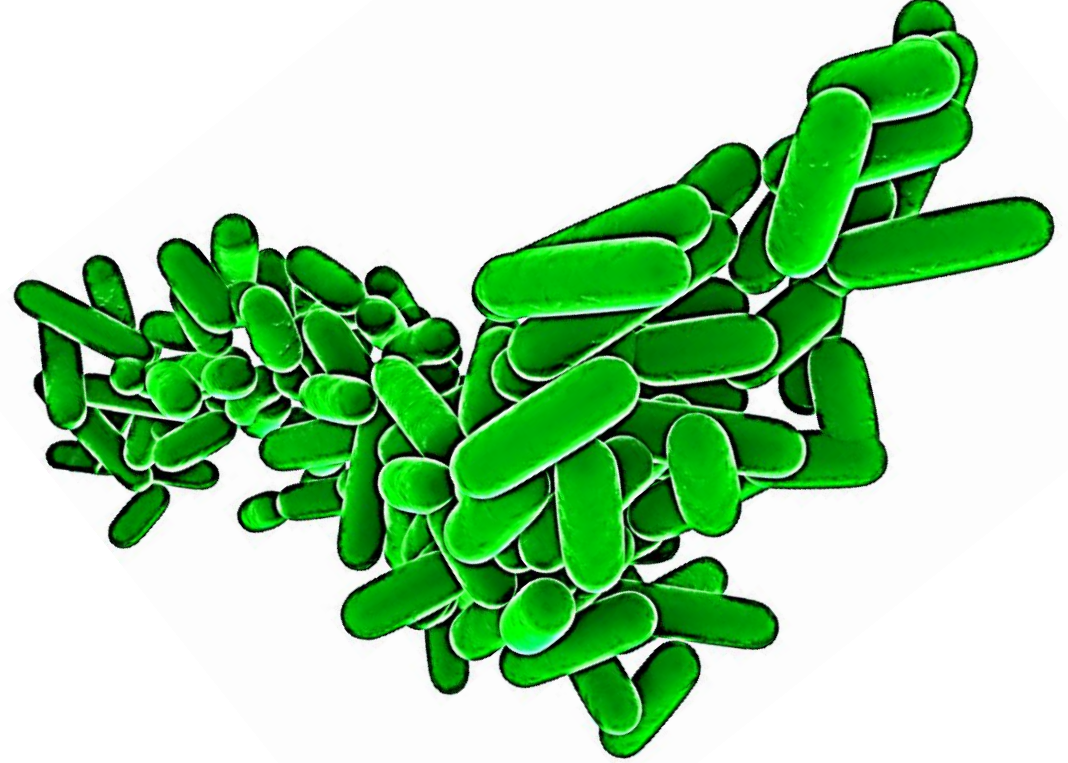
Probiotics = Good Gut Health

PROBİYOTİKLER

Probiyotikler, yeterli miktarda alındığı zaman konakçı üzerinde sağlığa yararlı etkiler sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (FAO/WHO, 2011).

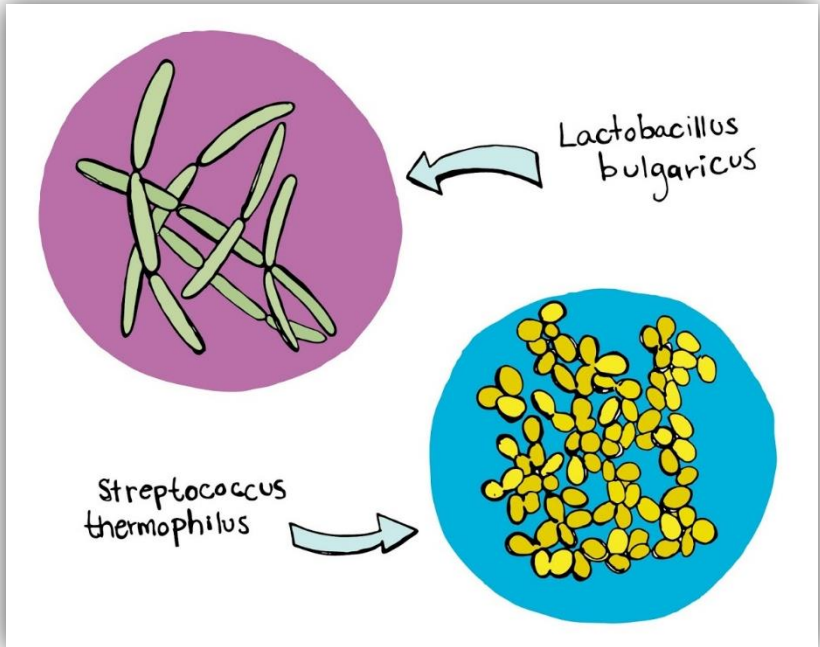


Elie Metchnikoff



Probiyotiklere olan ilgi 20. yüzyılın başlarında Rus bilim adamı Metchnikoff'un daha uzun bir yaşam için laktobasilleri içeren fermente süt ürünlerinin tüketimini tavsiye etmesiyle başlamıştır.

- Yirminci yüzyılın başlarında Metchnikoff tarafından izole edilen ve klasik yoğurt yapımında kullanılan *S. thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bakterilerinin **insan sindirim sisteminde canlılıklarını yeteri kadar koruyamadığı** belirlenmiştir.



- *S. thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'un bağırsak sisteminde yaşama yetenekleri çok düşük olduğundan, yoğurda ekstra fizyolojik nitelikler ve besin değeri kazandırmak amacıyla bu bakterilere ek olarak *L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. casei* ve *Bifidobacterium* subsp. gibi probiyotik bakterileri içeren kültürler kullanılabilmektedir.

Lactobacillus acidophilus

- *L. acidophilus*, ilk olarak 1900 yılında Alman bilim adamı Ernst Moro tarafından çocuk dışkılarından izole edilmiştir. 1936 yılında "*Thermobacterium intestinale*" olarak adlandırılan bu bakteri, 1970 yılında asidik ortamda gelişme gösterebilen laktik asit bakterisi anlamına gelen *Lactobacillus acidophilus* olarak yeniden adlandırılmıştır.



- Optimum gelişme pH'sı 5.5-6.0 olup, optimum gelişme 35-38°C'de gerçekleşmektedir.
- *L. acidophilus*, bağışıklık sisteminin ve antibiyotik tedavisi sonrası bağırsak florasının düzenlenmesi, farklı nedenlere bağlı diyarelerin hafifletilmesi, kolesterol düzeylerinin azaltılması, vitaminlerin üretilmesi ve laktoz intoleransının hafifletilmesi gibi birçok etkisinin olduğu bilinmektedir.

- PROBİYOTİKLER
- **SİNDİRİM SİSTEMİ**
 - **Gastrointestinal Modeller**
- MATERYAL ve METOT
 - Probiyotik Süt Ürünleri Üretimi
 - Dinamik *In Vitro* Gastrointestinal Modelin Oluşturulması
- BULGULAR ve TARTIŞMA
- SONUÇ



Ağız

- Çiğneme ve tükürükle karıştırma
- pH 5 - 7
- Geçiş süresi: 10 sn - 2 dk
- Tükürük enzimleri (amilaz, lingual lipaz)

Mide

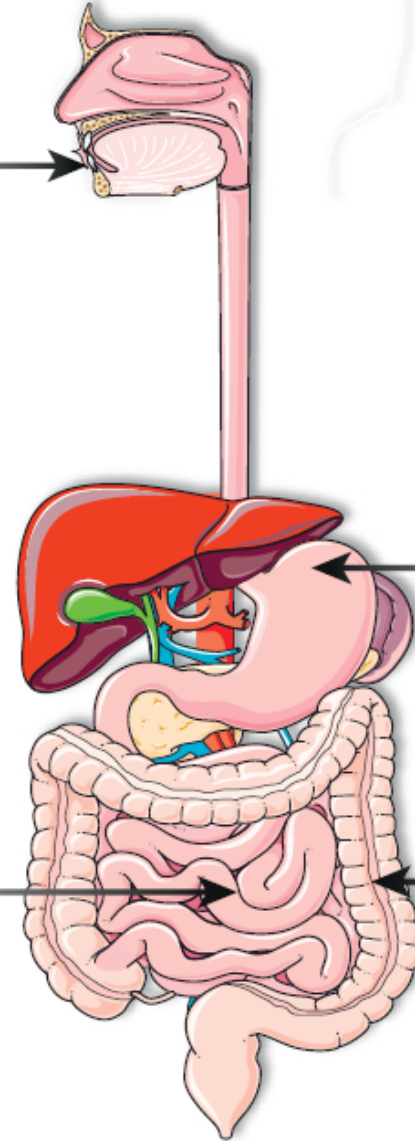
- Kimüsün mekanik ve enzimatik prosesi
- pH 1 - 5
- Geçiş süresi: 15 dk - 3 sa
- HCl, pepsin, gastrik lipaz

İnce bağırsak

- Makromoleküllerin yıkımı ve besinlerin emilimi
- pH 6 - 7.5
- Geçiş süresi: 2 - 5 sa
- Pankreas salgısı, safra, NaHCO₃

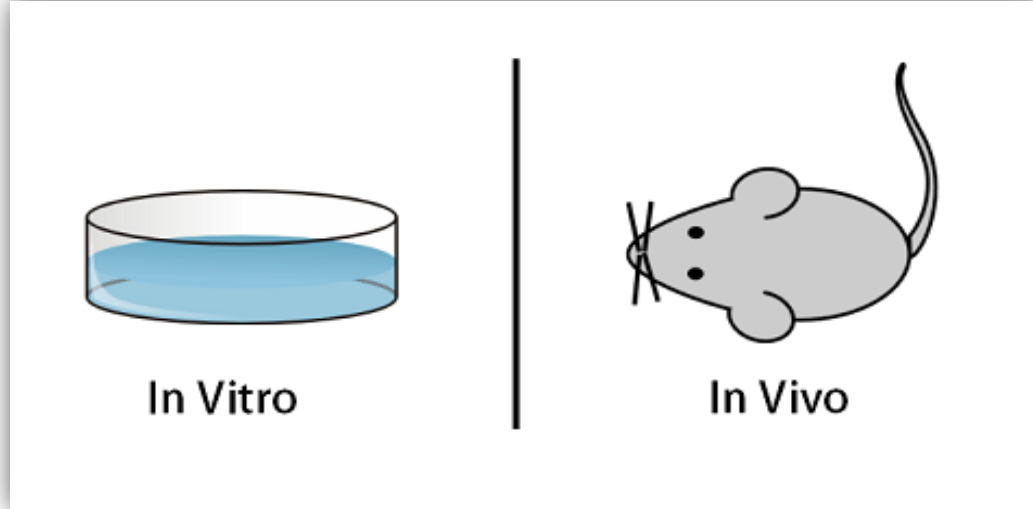
Kolon

- Sindirilmeyen besinlerin mikrobiyal fermentasyonu ve suyun reabsorpsiyonu
- pH 5 - 7
- Geçiş süresi: 12 - 24 sa
- Mikrobiyota



Gastrointestinal modeller

Gıda ve ilaçların sindirimini simüle eden *in vitro* çalışmalar; nispeten kolay, hızlı, güvenilir olduğu ve özellikle *in vivo* çalışmalarda karşılaşılan etik kısıtlamalar bulunmadığı için günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır.



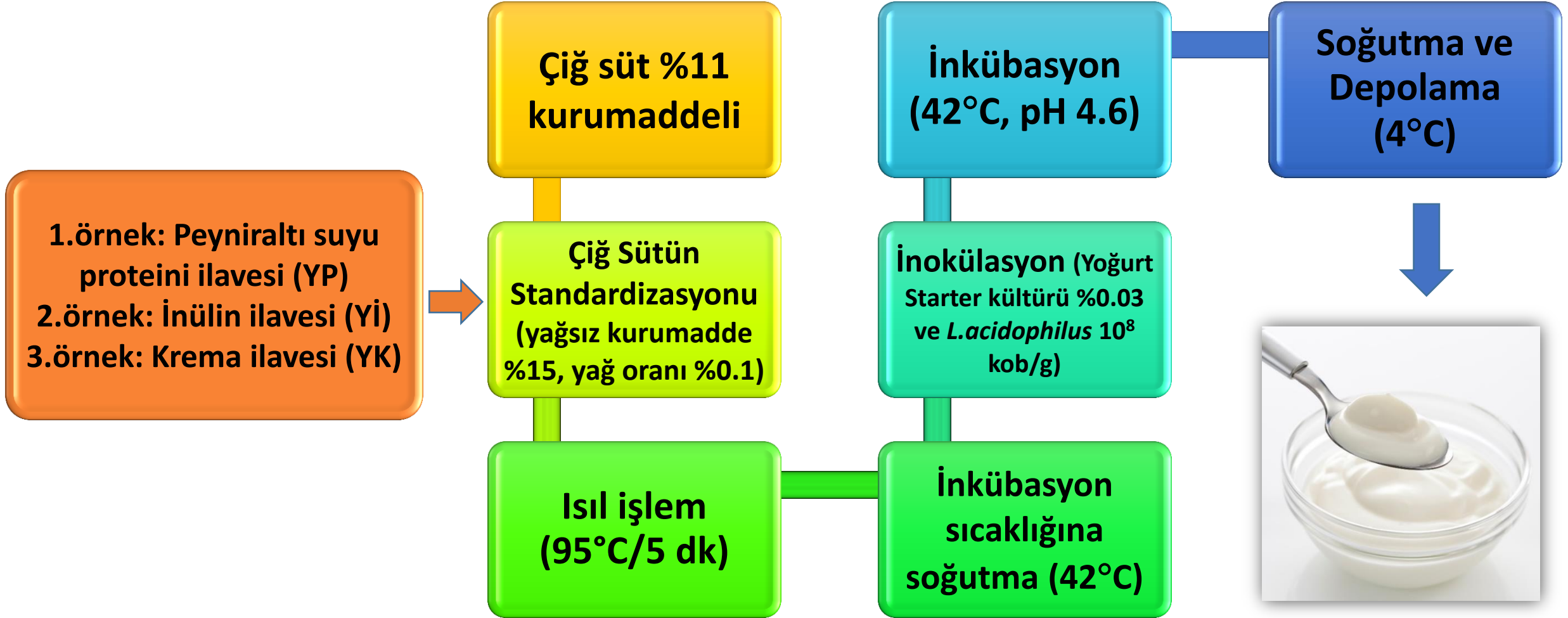
Gastrointestinal sindirim sistemini simüle eden *in vitro* gastrointestinal modeller;

- sindirim sistemindeki işlemlere maruz kalması istenen örneğin çoğunlukla hareketsiz olduğu ve hidrasyon, karıştırma ve kayma kuvveti gibi çeşitli fiziksel işlemlerin göz ardı edildiği statik modeller ile
- *in vivo* koşullarda gerçekleşen fiziksel ve mekanik işlemler ile zamansal değişikliklerin de simüle edildiği dinamik modeller olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.

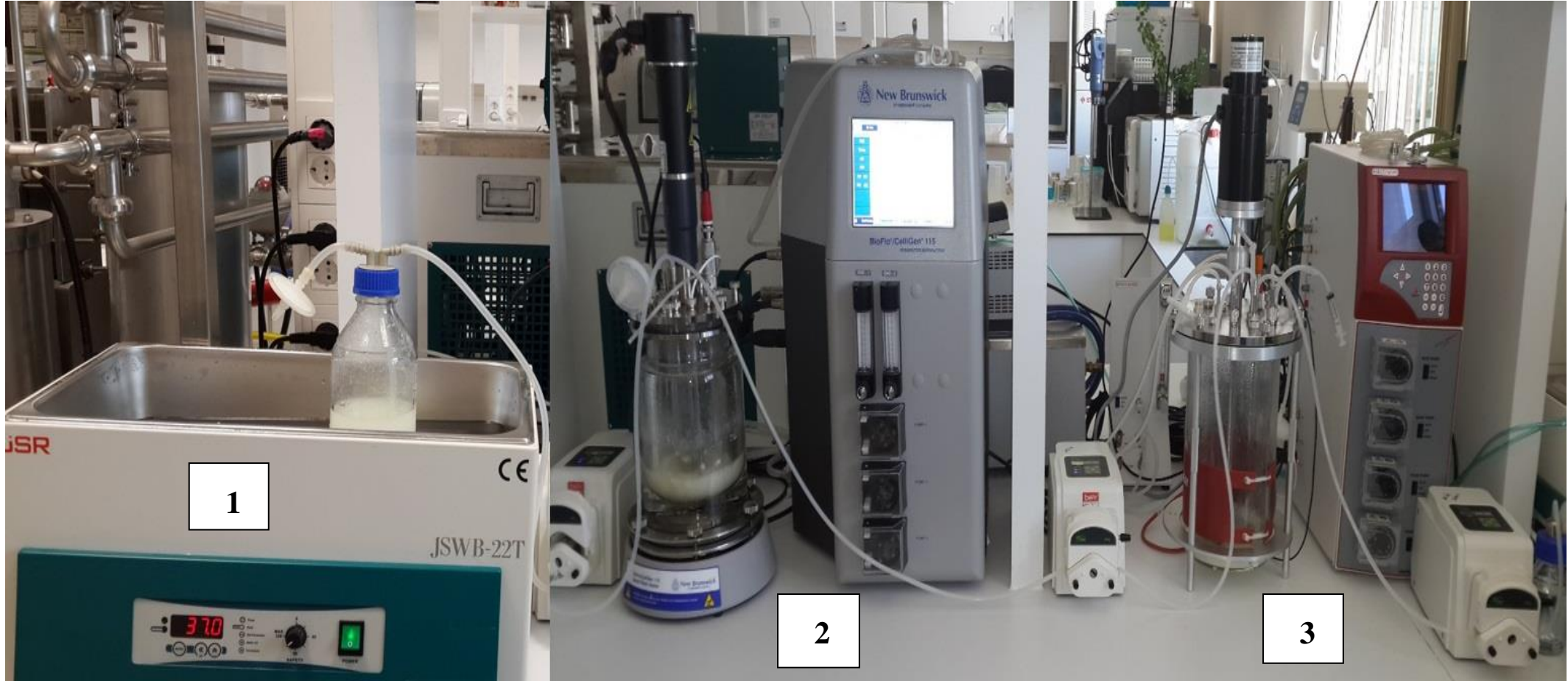
- PROBİYOTİKLER
 - *Lactobacillus acidophilus*
 - Probiyotik Süt Ürünleri
- SİNDİRİM SİSTEMİ
 - Sindirim Sistemi Modelleri
- **MATERYAL ve METOT**
 - Probiyotik Yoğurt Üretimi
 - Dinamik *In Vitro* Gastrointestinal Modelin Oluşturulması
- BULGULAR ve TARTIŞMA
- SONUÇ



Probiyotik Yoğurt Üretimi



Dinamik *in vitro* gastrointestinal modelin oluşturulması



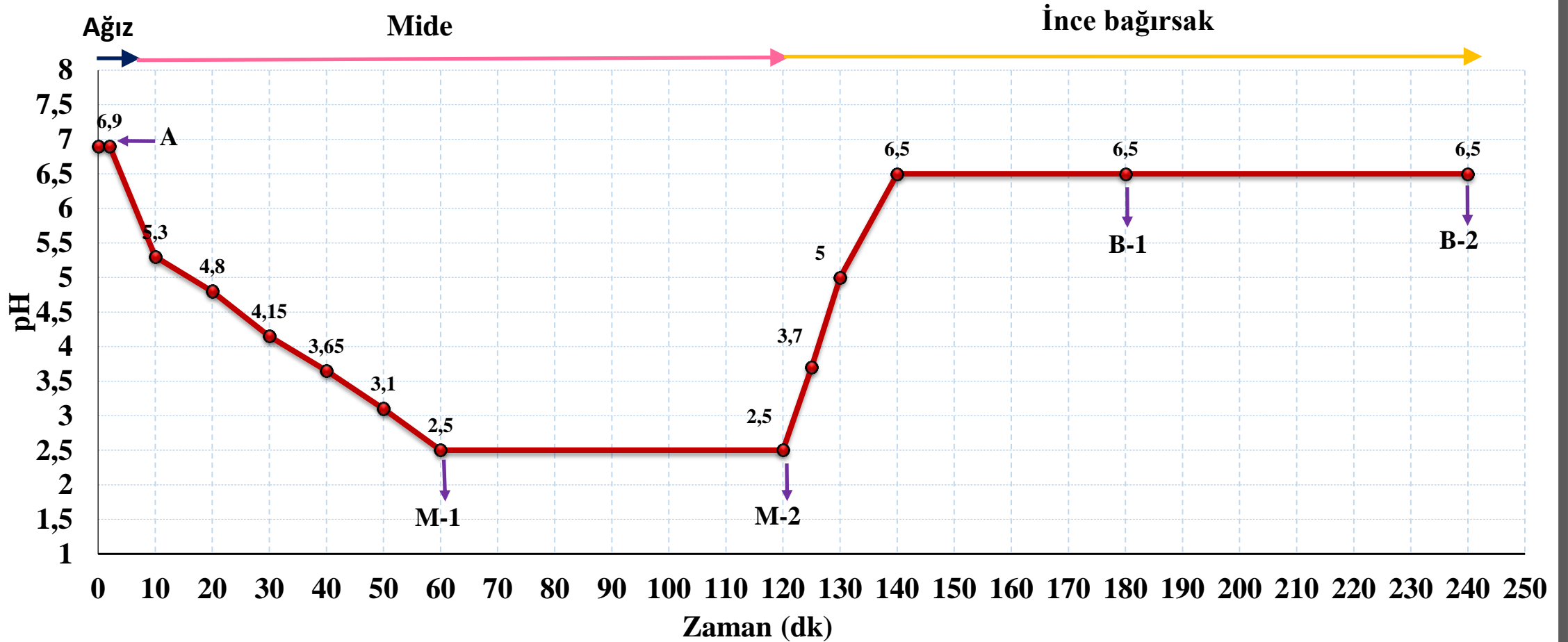
(1) Ağız, (2) Mide, (3) İnce bağırsak.



Simüle edilen parametreler;

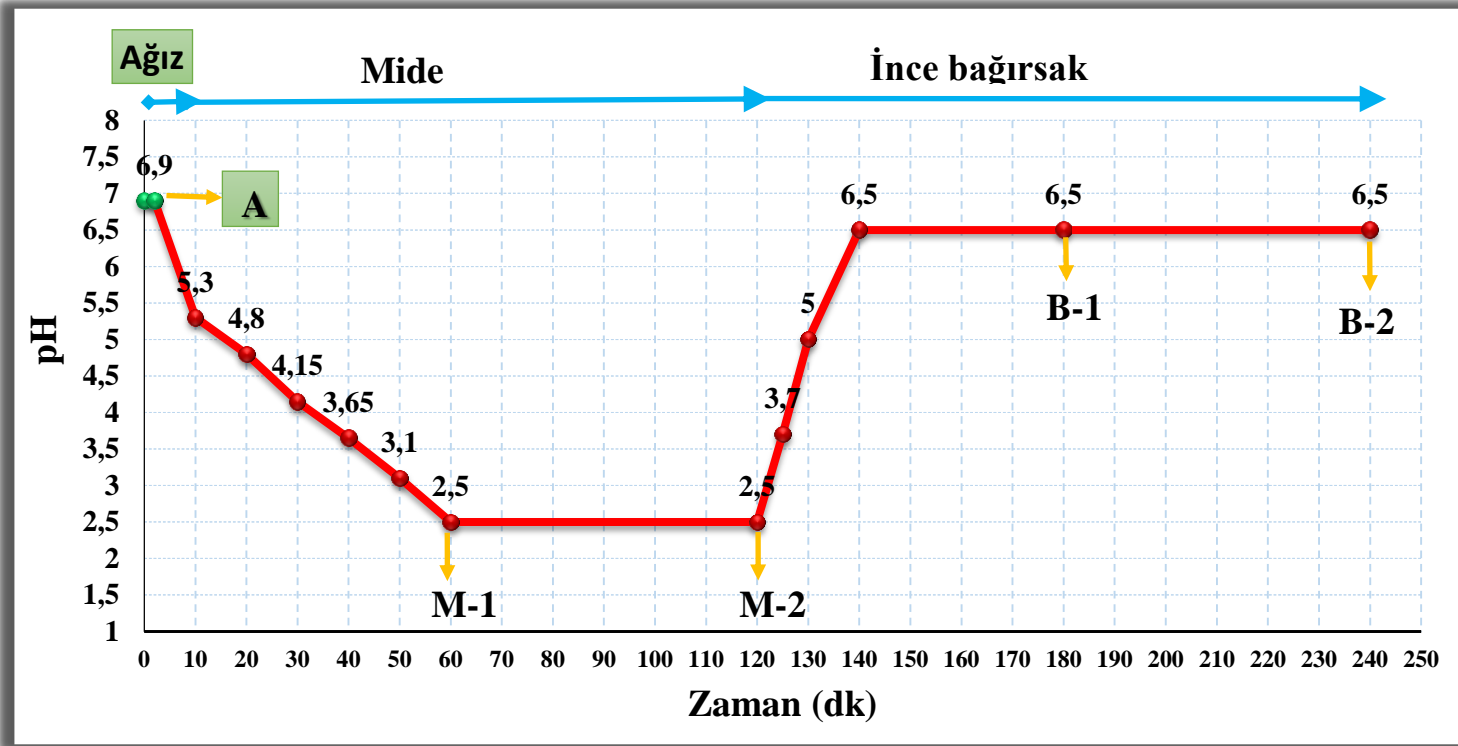
- Vücut sıcaklığı,
- pH,
- ağız bölgesinde tükürük salgısı kontrolü,
- Mide bölgesinde HCl ve pepsin salgısı kontrolü
- İnce bağırsak bölgesinde NaHCO_3 , pankreatin ve safra salgısı kontrolü
- Gastrointestinal sistem bölümlerinde kalma ve geçiş süreleri
- Anaerobik ortam (N_2 gazıyla yıkama)
- Karıştırma

Dinamik *in vitro* gastrointestinal modelin işleyişi



- A, M-1, M-2, B-1 ve B-2; ağız sonu, midede 1. saatin sonu, midede 2. saatin sonu, ince bağırsakta 1. saatin sonu, ince bağırsakta 2. saatin sonu olmak üzere örnekleme noktalarını temsil etmektedir

Dinamik *in vitro* gastrointestinal modelin ağız kısmı



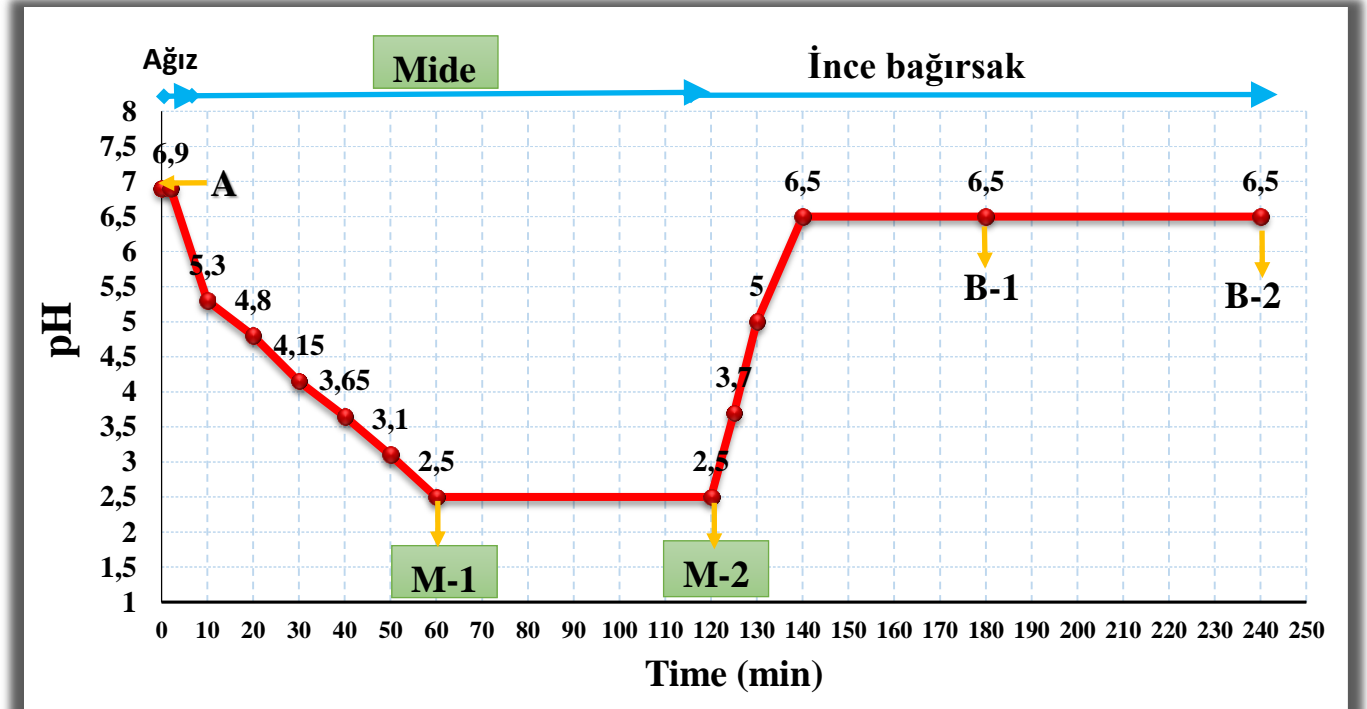
- Tükürük salgısını simüle etmek için **müsin**, **α -amilaz enzimi** ve **%40'lık NaOH** çözeltisi kullanılmıştır.
- Örnekler ağız ortamına girdikten sonra ortam pH'sı pH 6.9'a ayarlanmış ve 2 dk boyunca pH 6.9'da sabit kalması sağlanmıştır.



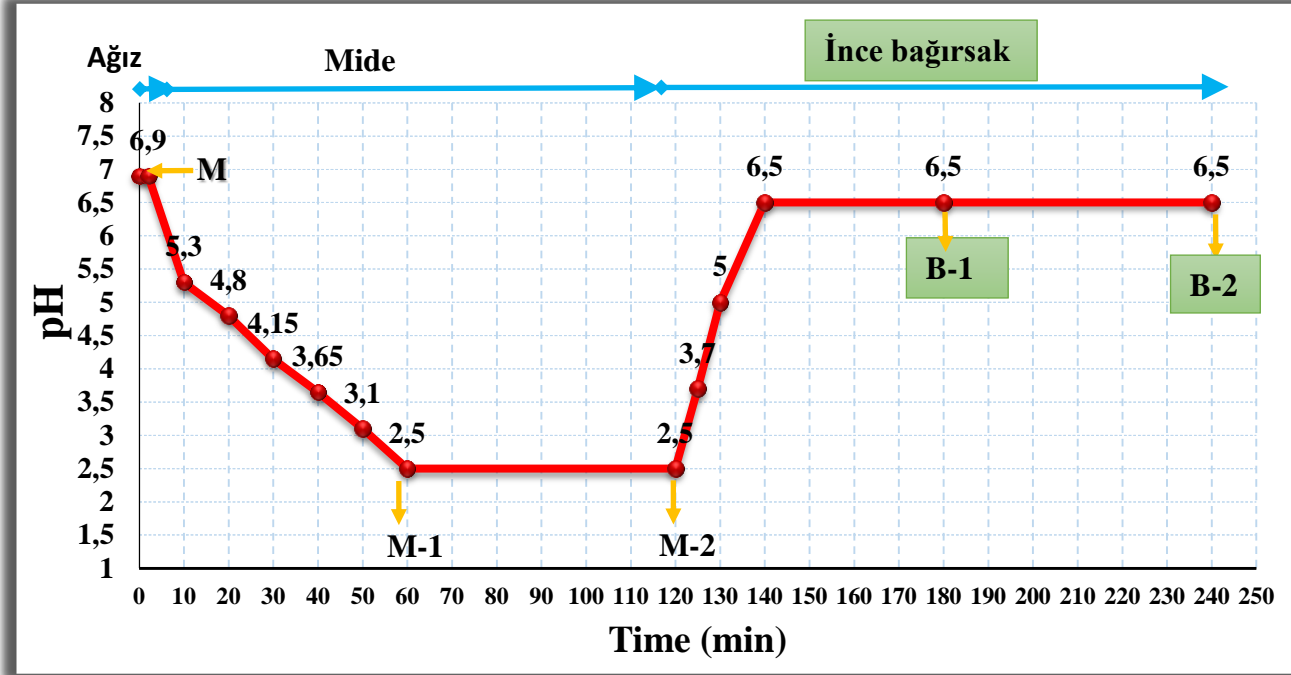
Dinamik *in vitro* gastrointestinal modelin mide kısmı



- Mide salgısını simüle etmek için **pepsin enzimi, müsin** ve **1 M HCl** çözeltisi kullanılmıştır.
- Ağız ortamından pH 6.9'da ayrılan örnek mideye ulaştıktan sonra 1 saat içerisinde kademeli olarak ortam pH'sının pH 2.5'a düşmesi ve sonrasında 1 saat boyunca pH 2.5'da sabit kalması sağlanmıştır.



Dinamik *in vitro* gastrointestinal modelin ince bağırsak kısmı



- İnce bağırsak salgısını simüle etmek için **pankreatin enzimleri, safra tuzu ve 1M NaHCO₃** çözeltisi kullanılmıştır.
- Mide ortamından pH 2.5'da ayrılan örnek ince bağırsağa ulaştıktan sonra 15-20 dk içerisinde kademeli olarak ortam pH'sının pH 6.5'a yükselmesi ve sindirim işlemi sonuna kadar pH 6.5'da sabit kalması sağlanmıştır.



- PROBİYOTİK
- SİNDİRİM SİSTEMİ
 - Gastrointestinal Modeller
- MATERYAL ve METOT
 - Probiyotik Yoğurt Üretimi
 - Dinamik *In Vitro* Gastrointestinal Modelin Oluşturulması
- **BULGULAR ve TARTIŞMA**
- SONUÇ



Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus sayısı

Probiyotik yoğurt örneklerinde bulunan *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'un dinamik in vitro gastrointestinal modelden geçişi süresince belirlenen sayım sonuçları (log kob/g)

Örnek	Süre (dk)	YP	Yİ	YK
Ü	0	7,95±0,03	8,15±0,02	8,14±0,02
A	2	7,90±0,02	8,03±0,01	8,10±0,08
M-1	60	7,25±0,01	7,89±0,05	8,08±0,01
M-2	120	4,14±0,65	5,37±0,05	5,55±0,06
B-1	180	3,66±0,00	4,80±0,01	5,15±0,01
B-2	240	3,75±0,05	4,74±0,01	5,08±0,01

Ü: Ürünlerde bulunan *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sayısı, **A:** Ağız sonu, **M-1:** Midede 1. saatin sonu, **M-2:** Midede 2. saatin sonu, **B-1:** İnce bağırsakta 1. saatin sonu, **B-2:** İnce bağırsakta 2. saatin sonu olmak üzere örnekleme noktalarını temsil etmektedir.

YP: Peyniraltı suyu proteini ilavesi ile standardize edilmiş sütün üretilen probiyotik yoğurt örneği

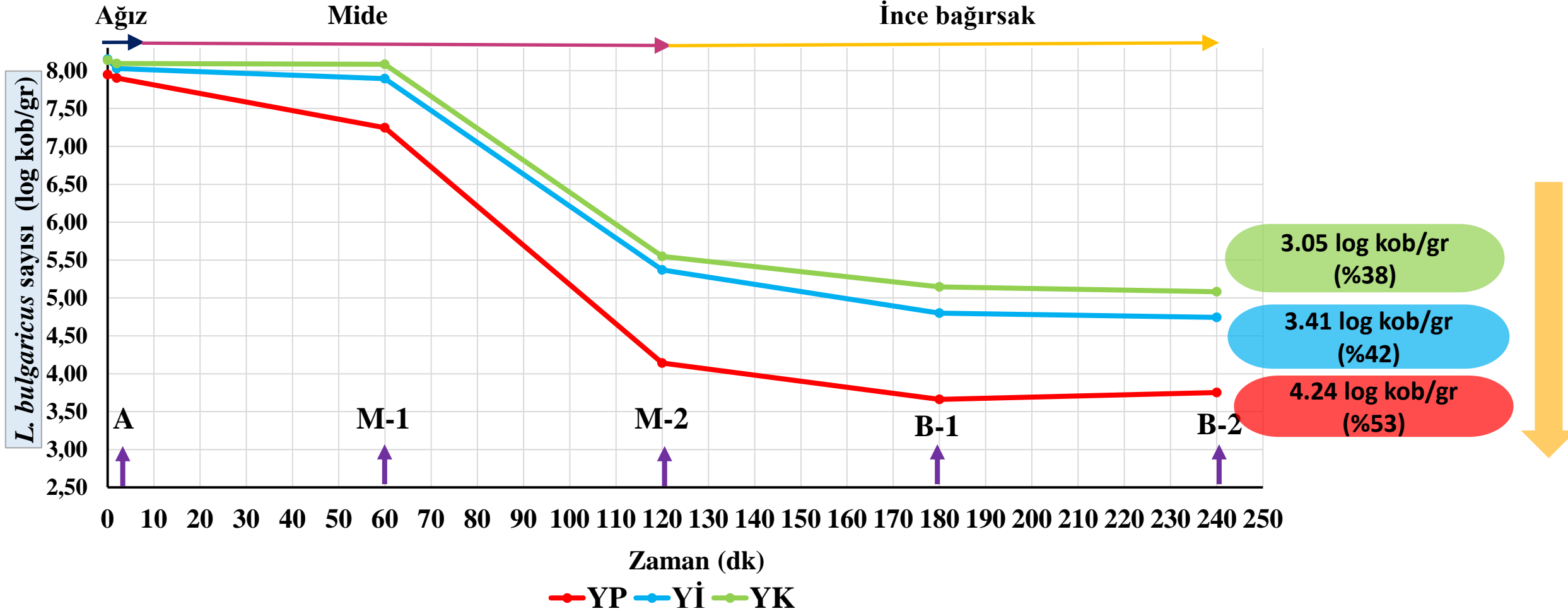
Yİ: İnülin ilavesi ile standardize edilmiş sütün üretilen probiyotik yoğurt örneği

YK: Krema ilavesi ile standardize edilmiş sütün üretilen probiyotik yoğurt örneği

<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> sayısındaki azalma oranı (%)	
Gastrointestinal sistem işlem basamakları	
Ağız sonu (A)	0.30 c
Midede 1. saatin sonu (M-1)	2.74 c
Midede 2. saatin sonu (M-2)	20.18 b
İnce bağırsakta 1. saatin sonu (B-1)	41.75 a
İnce bağırsakta 2. saatin sonu (B-2)	44.04 a
Ürün çeşidi	
YP	27.57 a
Yİ	20.16 a
YK	17.68 a
Varyasyon kaynakları	
Gastrointestinal sistem işlem basamakları (G)	***
Ürün çeşidi (Ü)	
GxÜ	

***P<0.001 düzeyinde önemli

Dinamik *in vitro* gastrointestinal modelden geçiş süresince örneklerde belirlenen ortalama *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sayılarına ait logaritmik değerlerdeki değişim



YP: Peyniraltı suyu proteini ilavesi ile standardize edilmiş sütte üretilen probiyotik yoğurt örneği

Yİ: İnülin ilavesi ile standardize edilmiş sütte üretilen probiyotik yoğurt örneği

YK: Krema ilavesi ile standardize edilmiş sütte üretilen probiyotik yoğurt örneği

Streptococcus thermophilus sayısı

Probiyotik yoğurt örneklerinde bulunan *S. thermophilus* 'un dinamik *in vitro* gastrointestinal modelden geçişi süresince belirlenen sayım sonuçları (log kob/g)

Örnek	Süre (dk)	YP	Yİ	YK
Ü	0	8,52±0,15	9,05±0,01	9,10±0,05
A	2	8,49±0,03	9,01±0,03	9,06±0,02
M-1	60	6,69±0,00	3,52±0,02	6,31±0,01
M-2	120	3,06±0,01	0,00±0,00	5,42±0,04
B-1	180	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
B-2	240	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

Ü: Ürünlerde bulunan *S. thermophilus* sayısı, **A:** Ağız sonu, **M-1:** Midede 1. saatin sonu, **M-2:** Midede 2. saatin sonu, **B-1:** İnce bağırsakta 1. saatin sonu, **B-2:** İnce bağırsakta 2. saatin sonu olmak üzere örnekleme noktalarını temsil etmektedir.

YP: Peyniraltı suyu proteini ilavesi ile standardize edilmiş sütte üretilen probiyotik yoğurt örneği

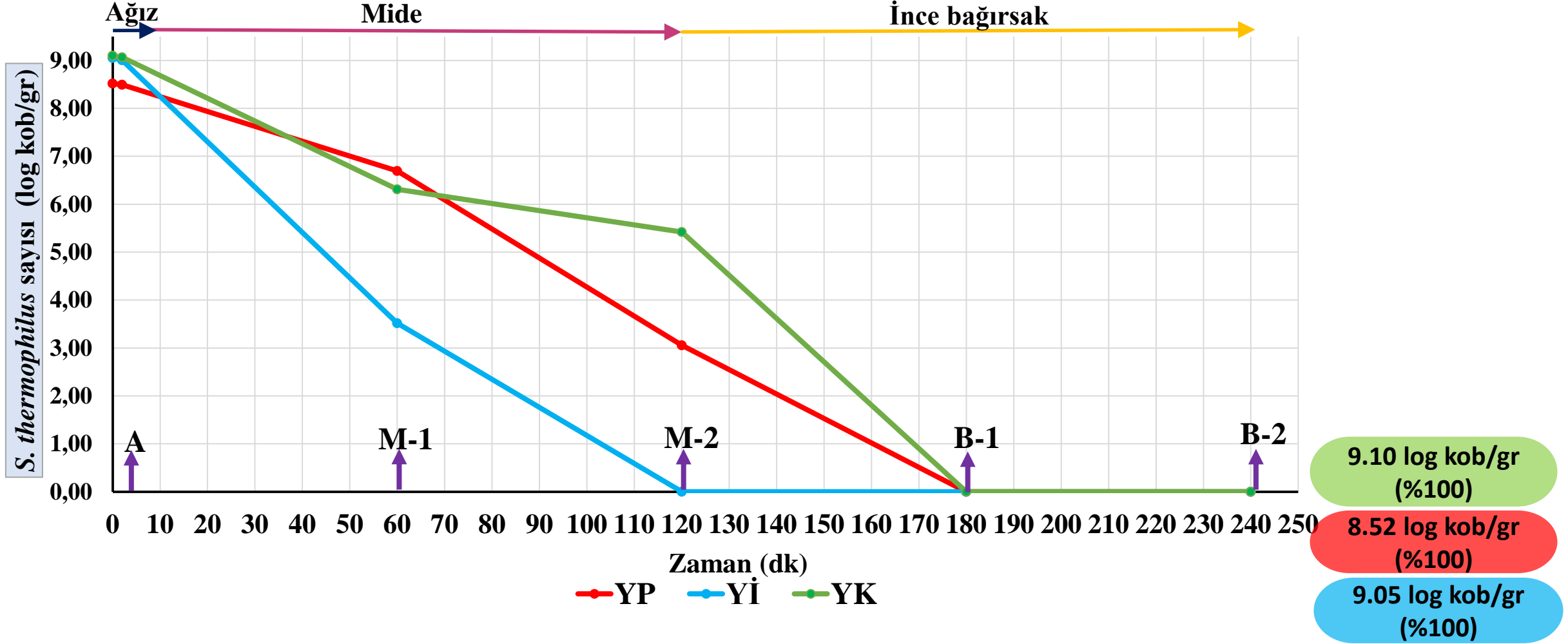
Yİ: İnülin ilavesi ile standardize edilmiş sütte üretilen probiyotik yoğurt örneği

YK: Krema ilavesi ile standardize edilmiş sütte üretilen probiyotik yoğurt örneği

<i>S. thermophilus</i> sayısındaki azalma oranı (%)	
Gastrointestinal sistem işlem basamakları	
Ağız sonu (A)	0.31 c
Midede 1. saatin sonu (M-1)	19.02 c
Midede 2. saatin sonu (M-2)	52.99 b
İnce bağırsakta 1. saatin sonu (B-1)	84.02 a
İnce bağırsakta 2. saatin sonu (B-2)	100.00 a
Ürün çeşidi	
YP	47.16 a
Yİ	62.34 a
YK	44.29 a
Varyasyon kaynakları	
Gastrointestinal sistem işlem basamakları (G)	***
Ürün çeşidi (Ü)	
GxÜ	

***P<0.001 düzeyinde önemli

Dinamik *in vitro* gastrointestinal modelden geçiş süresince örneklerde belirlenen ortalama *S. thermophilus* sayılarına ait logaritmik değerlerdeki değişim



YP: Peyniraltı suyu proteini ilavesi ile standardize edilmiş sütte üretilen probiyotik yoğurt örneği

Yİ: İnülin ilavesi ile standardize edilmiş sütte üretilen probiyotik yoğurt örneği

YK: Krema ilavesi ile standardize edilmiş sütte üretilen probiyotik yoğurt örneği

Lactobacillus acidophilus LA-5 sayısı

Probiyotik yoğurt örneklerinde bulunan *L. acidophilus* LA-5'in dinamik *in vitro* gastrointestinal modelden geçişi süresince belirlenen sayım sonuçları (log kob/g)

Örnek	Süre (dk)	YP	Yİ	YK
Ü	0	8,09±0,01	8,16±0,00	8,21±0,01
A	2	8,07±0,02	8,11±0,04	8,15±0,03
M-1	60	8,05±0,00	8,06±0,02	8,06±0,05
M-2	120	4,48±0,09	6,23±0,09	6,65±0,01
B-1	180	4,19±0,06	4,99±0,03	5,21±0,02
B-2	240	3,20±1,00	4,83±0,07	5,12±0,10

Ü: Ürünlerde bulunan *L. acidophilus* LA-5 sayısı, **A**: Ağız sonu, **M-1**: Midede 1. saatin sonu, **M-2**: Midede 2. saatin sonu, **B-1**: İnce bağırsakta 1. saatin sonu, **B-2**: İnce bağırsakta 2. saatin sonu olmak üzere örnekleme noktalarını temsil etmektedir.

YP: Peyniraltı suyu proteini ilavesi ile standardize edilmiş süttten üretilen probiyotik yoğurt örneği

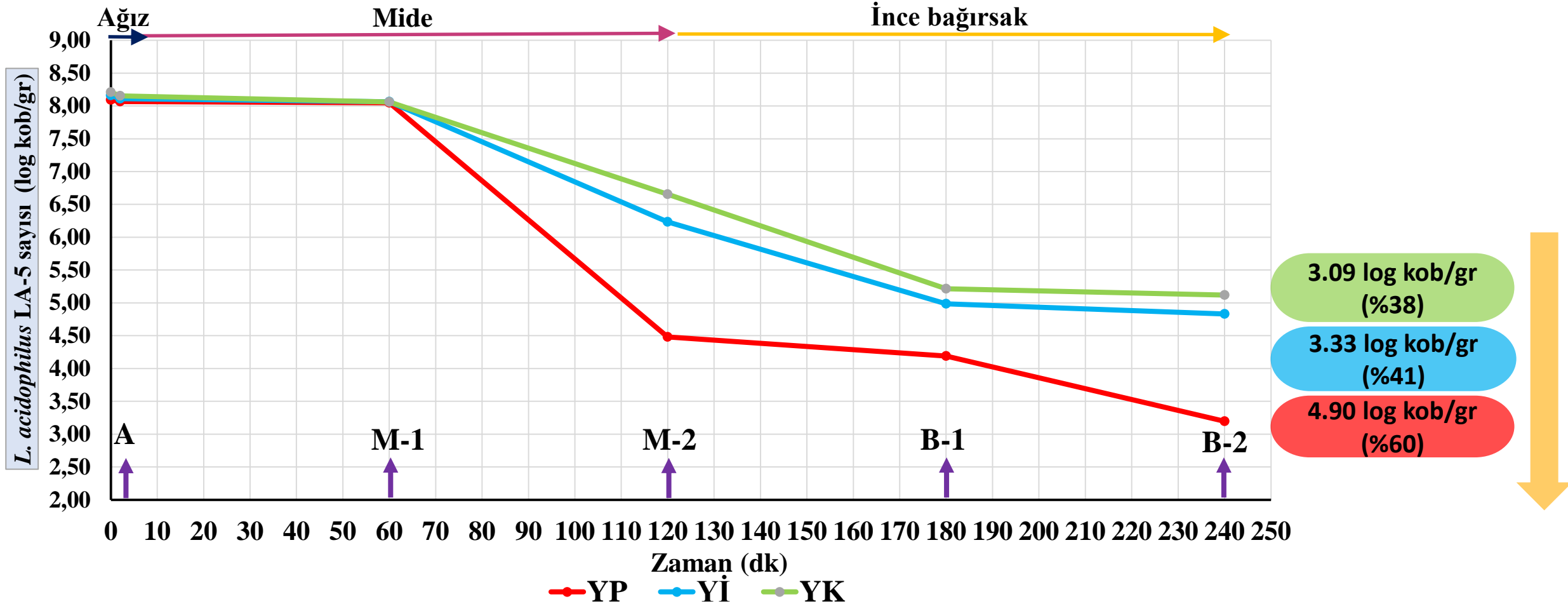
Yİ: İnülin ilavesi ile standardize edilmiş süttten üretilen probiyotik yoğurt örneği

YK: Krema ilavesi ile standardize edilmiş süttten üretilen probiyotik yoğurt örneği

<i>L. acidophilus</i> LA-5 sayısındaki azalma oranı (%)	
Gastrointestinal sistem işlem basamakları	
Ağız sonu (A)	0.51 d
Midede 1. saatin sonu (M-1)	1.17 d
Midede 2. saatin sonu (M-2)	29.06 c
İnce bağırsakta 1. saatin sonu (B-1)	41.20 b
İnce bağırsakta 2. saatin sonu (B-2)	46.31 a
Ürün çeşidi	
YP	30.84 a
Yİ	21.02 b
YK	19.10 b
Varyasyon kaynakları	
Gastrointestinal sistem işlem basamakları (G)	***
Ürün çeşidi (Ü)	***
GxÜ	***

***P<0.001 düzeyinde önemli

Dinamik *in vitro* gastrointestinal modelden geçiş süresince örneklerde belirlenen ortalama *L. acidophilus* LA-5 sayılarına ait logaritmik değerlerdeki değişim



YP: Peyniraltı suyu proteini ilavesi ile standardize edilmiş sütte üretilen probiyotik yoğurt örneği

Yİ: İnülin ilavesi ile standardize edilmiş sütte üretilen probiyotik yoğurt örneği

YK: Krema ilavesi ile standardize edilmiş sütte üretilen probiyotik yoğurt örneği

- PROBİYOTİKLER
- SİNDİRİM SİSTEMİ
 - Gastrointestinal Modeller
- MATERYAL ve METOT
 - Probiyotik Yoğurt Üretimi
 - Dinamik *In Vitro* Gastrointestinal Modelin Oluşturulması
- BULGULAR ve TARTIŞMA
- **SONUÇ**



Sonuç

- Bu çalışmada, probiyotik bakteri olarak *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak probiyotik yoğurt üretilmiştir. Üretilen probiyotik örnekler, laboratuvar koşullarında oluşturulan dinamik gastrointestinal modelden geçirilmiştir. Peyniraltı suyu proteini, inülin ve krema kullanılarak %15 kurumadde değerine standardize edilen çiğ sütlerden üretilen probiyotik yoğurt ürünlerindeki *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* sayıları karşılaştırmalı olarak ortaya konulmuştur.
- Çalışma sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde; ürünlerin bileşimindeki yağ (%), karbonhidrat (%), protein (%) miktarlarındaki farklıların üretimlerde kullanılan *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus*'un dinamik *in vitro* gastrointestinal modelden geçiş süresince canlılığı üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı bununla birlikte *L. acidophilus*'un dinamik *in vitro* gastrointestinal modelden geçiş süresince canlılığını önemli derecede etkilediği görülmüştür.

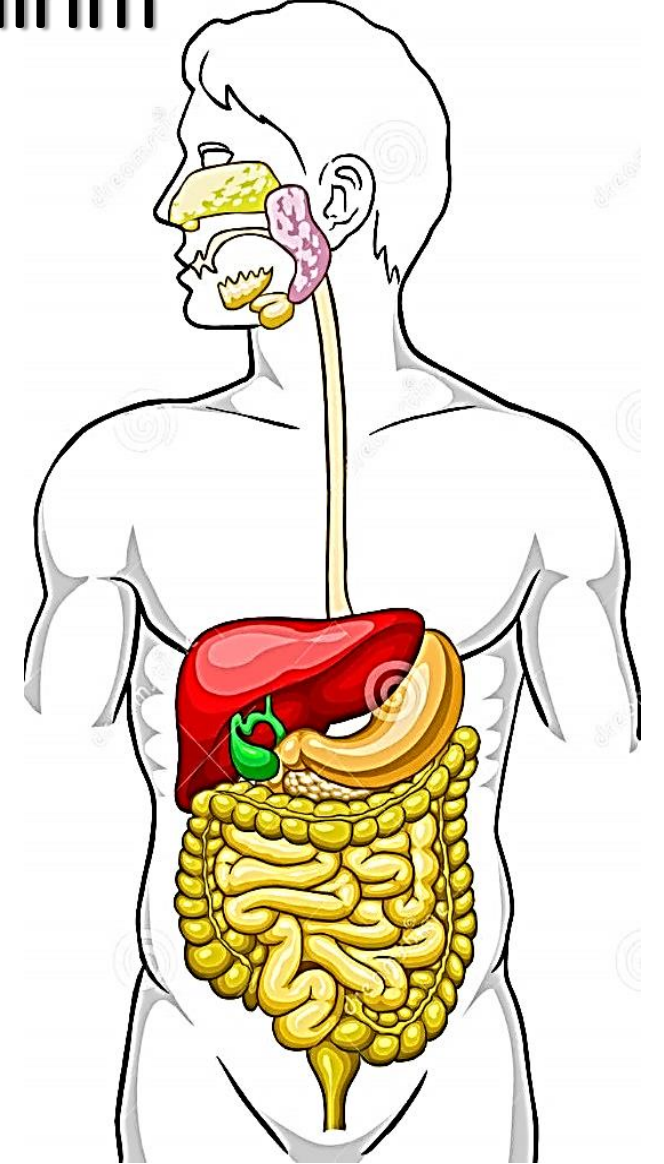
Sonuç

- Probiyotik yoğurt örneklerinde bulunan *L. acidophilus*'un dinamik *in vitro* gastrointestinal modelden geçişi sırasında canlılıklarında en yüksek azalmanın peyniraltı suyu proteini ilavesi ile standardize edilmiş sütte üretilen probiyotik yoğurt örneğinde olduğu ve bu örneği sırasıyla krema ilavesi ile standardize edilmiş sütte üretilen probiyotik yoğurt ve inülin ilavesi ile standardize edilmiş sütte üretilen probiyotik yoğurt örneklerinin takip ettiği belirlenmiştir.
- Yoğurt bileşimindeki yüksek yağ oranının, mikroorganizmaya sağladığı anaerobik ortam ve yüksek tamponlama kapasitesi sayesinde *L. acidophilus* bakterisi üzerinde simüle edilmiş gastrik ortama karşı koruyucu etki yaratmış olabileceği değerlendirilmiştir. Ayrıca inülin ilavesi ile standardize edilmiş sütte üretilen örneklerde, ortamda bulunan fermente edilebilir karbonhidrat varlığının bakteri hücresi içerisinde ATP üretimini teşvik ederek, bakteri sitoplazmasındaki asidin dışarı pompalanmasını sağladığı ve böylelikle *L. acidophilus* bakterisi üzerinde simüle edilmiş gastrik ortama karşı koruyucu etki yaratmış olabileceği değerlendirilmiştir.

TEŐEKKÜRLER...

Dinamik *in vitro* gastrointestinal modelde sindirim

Çiğneme	300 gr örnek oda sıcaklığında 300 gr steril su ilave edildikten sonra uygun bir karıştırıcıyla homojen hale getirilmiştir.
Simüle tükürük salgısı	2 gr/L α-amilaz enzimi ve 1 gr/L müsin steril su içerisinde çözündürülmüştür. Simüle tükürük salgısı 0,05 mL/gr örnek olacak şekilde 5mL/dk hızla ağız ortamına ilave edilmiştir.
Simüle mide salgısı	25 gr/L pepsin ve 23 gr/L müsin steril mide tampon çözeltisi* içinde çözündürülmüştür. Ağız ortamında sindirime uğrayan örnek 100 mL/dk akış hızıyla mide ortamını temsil eden reaktöre geçtikten sonra simüle mide salgısı 0,05 mL mide salgısı/gr örnek olacak şekilde mideyi temsil eden reaktöre 0,25 mL/dk hızla ilave edilmiştir.
Simüle ince bağırsak salgısı	1 gr/L pankreatin ve 12gr/L safra steril ince bağırsak tampon çözeltisi** içinde çözündürülmüştür. Mide ortamında sindirime uğrayan örnek 100mL/dk akış hızıyla ince bağırsağı temsil eden reaktöre 3 mL/dk hızla ilave edilmiştir.



*Mide tampon çözeltisi: 2,2 gr/L KCl, 6,2 gr/L NaCl, 1,2 gr/L NaHCO₃, 0,22 gr/L CaCl₂

**İnce bağırsak tampon çözeltisi: 5,0 gr/L NaCl, 0,6 gr/L KCl, 0,25 gr/L CaCl₂