

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOĞAL KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN BAZI PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI VE *İN VİTRO* BAĞIRSAK MODELİNDE
PATOJENLERİN TUTUNMASINI ENGELLEME
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Duygu ALP

**Danışman
Doç. Dr. Hakan KULEAŞAN**

**DOKTORA TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
ISPARTA – 2018**



©2018 [Duygu ALP]

TEZ ONAYI

Duygu ALP tarafından hazırlanan " **Doğal Kaynaklardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması ve *in vitro* Bağırsak Modelinde Patojenlerin Tutunmasını Engelleme Özelliklerinin Belirlenmesi** " adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**'nda **Doktora TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

Doç. Dr. Hakan KULEAŞAN
Süleyman Demirel Üniversitesi



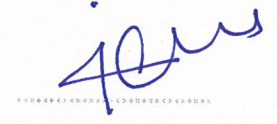
Jüri Üyesi

Prof. Dr. Yasin TUNCER
Süleyman Demirel Üniversitesi



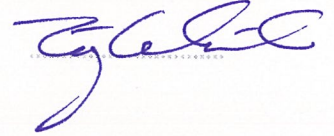
Jüri Üyesi

Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Tuğba KÖK TAŞ
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Hale SEÇİLMİŞ CANBAY
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi



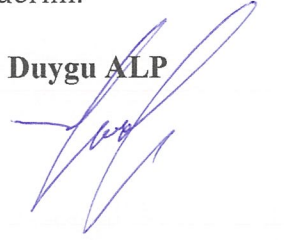
Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Yasin TUNCER

TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Duygu ALP



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. Bağırsak Epitel Yapısı ve Fizyolojisi	4
2.2. Mide Bağırsak Sisteminde Bağışıklık	6
2.2.1. Bağırsağın Bağışıklık Sistemindeki Fonksiyonu.....	6
2.3. Bağırsak Yapısı ve Mikrobiyotası.....	8
2.4. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri	11
2.4.1. Laktik Asit Bakterilerinin Bağırsaktaki Önemi ve Etkileri	13
2.4.2. Laktik Asit Bakterilerinin Epitel Yüzeğe Tutunması ve Önemi.....	14
2.5. Probiyotikler	19
2.5.1. Probiyotik mikroorganizmaların özellikleri	19
2.5.2. Probiyotiklerin etki mekanizması	23
2.5.3. Probiyotik özellik taşıyan laktik asit bakterilerinin özellikleri.....	24
2.5.3.1. Düşük ph ve safra tuzlarına direnç	24
2.5.3.2. Pepsin ve pankreatine karşı direnç	25
2.5.3.3. Fenol direnci ve lizozim toleransı	26
2.5.3.4. Antibiyotik direnci	27
2.5.3.5. Ekzopolisakkarit üretimi ve kolesterol asimilasyonu	28
2.5.3.6. Antimikrobiyal etki	31
2.5.3.7. Sindirim sistemi modelleri	32
3. MATERYAL VE YÖNTEM	33
3.1. Materyal.....	33
3.2. Yöntem	33
3.2.1. Muhtemel Laktobasil suşlarının izolasyonu ve cins düzeyinde tanısı.....	33
3.2.2. <i>Lactobacillus</i> suşlarının ph 9.6’da gelişiminin belirlenmesi	34
3.2.3. % 6.5 NaCl dirençliliklerinin belirlenmesi	34
3.2.4. Glikozdan gaz oluşturma özelliklerinin belirlenmesi	34
3.2.5. Safra tuzuna karşı gelişimlerinin belirlenmesi	34
3.2.6. Düşük pH’ ya karşı gelişimlerinin belirlenmesi	35
3.2.7. Pepsine karşı gelişimin belirlenmesi	35
3.2.8. Pankreatine karşı gelişimin belirlenmesi	36
3.2.9. Lizozim toleransının belirlenmesi	36
3.2.10. Fenol direncinin belirlenmesi	36
3.2.11. Antibiyotik dirençliliğin belirlenmesi.....	37
3.2.12. 16S Mikrobiyal tanımlama analizi.....	37
3.2.13. Ekzopolisakkarit üretimlerinin belirlenmesi.....	37
3.2.14. Kolesterol asimilasyon yeteneklerinin belirlenmesi	38
3.2.15. Otoagregasyon özelliklerinin belirlenmesi	38
3.2.16. Koagregasyon özelliklerinin belirlenmesi	39
3.2.17. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi.....	39
3.2.17.1. Suşların test bakterileri üzerine genel inhibisyon etkileri	39

3.2.18. Sindirim sistemi modellemesi.....	40
3.2.19. Suşların bağırsak hücrelerine tutunma özelliğinin taramalı elektron mikroskopunda (SEM) görüntülenmesi	41
3.2.20. Bağırsak epitellerinin (brush border) hazırlanması ve İzolatların bağırsak hücrelerine tutunma ve patojenlerin tutunmalarını engelleme yeteneklerinin belirlenmesi.....	41
3.2.20.1. Bağırsak epitellerinin (brush border) hazırlanması.....	41
3.2.20.2. İzolatların bağırsak hücrelerine tutunma ve patojenlerin tutunmalarını engelleme yeteneklerinin belirlenmesi.....	42
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	46
4.1. Muhtemel <i>Lactobasillus</i> Suşlarının İzolasyonu ve Cins Düzeyinde Tanısı....	46
4.2. Safra Tuzuna Karşı Gelişimlerinin Belirlenmesi	48
4.3. Düşük pH’da Gelişime	53
4.4. Pepsine Karşı Gelişimlerinin Belirlenmesi	59
4.5. Pankreatine Karşı Gelişimin Belirlenmesi	62
4.6. Antibiyotik Direnci.....	64
4.7. Lizozim Direnci.....	73
4.8. Fenol Dirençliliği	76
4.9. Ekzopolisakkarit Üretimi	78
4.10. Kolesterol Asimilasyon Yetenekleri.....	80
4.11. Otoagregasyon ve Koagregasyon Özellikleri.....	82
4.12. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları	86
4.13. Sindirim Sistemi Modellemesi	89
4.14. İzolatların Bağırsak Hücrelerine Tutunma ve Patojenlerin Tutunmalarını Engelleme Yeteneklerinin Belirlenmesi	91
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	103
KAYNAKLAR	105
ÖZGEÇMİŞ	123

ÖZET

Doktora Tezi

DOĞAL KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BAZI PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE *İN VİTRO* BAĞIRSAK MODELİNDE PATOJENLERİN TUTUNMASINI ENGELLEME ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Duygu ALP

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hakan KULEAŞAN

Bu çalışmanın amacı, farklı illerden temin edilen gıda ve bitkilerden laktik asit bakterileri izole edilerek probiyotik olma özellikleri ile *in vitro* bağırsak modelinde tutunma ve patojenlerin tutunmasını engelleme özelliklerinin belirlenmesidir. Bu amaçla izole edilen 69 adet laktik asit bakterisinin düşük pH, pepsin, pankreatin, safra tuzları, lizozim, fenol dirençlilikleri belirlenmiştir. Ayrıca suşların antibiyotik dirençlilikleri, ekzopolisakkarit üretimleri, kolesterol asimilasyon yetenekleri ile antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. Gastrointestinal sistem dayanım testleri ve izolasyon kaynakları göz önüne alınarak 15 adet izolat seçilmiştir. İzolatlardan 9 tanesi ekzopolisakkarit üreticisi olup, *Lactobacillus plantarum* DA255 suşu 11.9 mg/L ile en yüksek ekzopolisakkarit üretici suş olmuştur. İzolatların toplam kolesterol asimilasyon yüzdeleri; % 60.71 ile % 16.71 arasında değişmektedir. EPS üreticisi olmayan *Leuconostoc lactis* DA268 % 60.71 ile en yüksek asimilasyonu sağlamıştır. *In vitro* bağırsak tutunması modeli için seçilen izolatlar denemeyi % 76.38 ile % 84.65 arasında tutunma yüzdeleri ile tamamlamışlardır. Çalışmamızda izolatların, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* Tip I, *Salmonella enterica* serotype Enteritidis, *Listeria monocytogenes* ve *Clostridium difficile*'nin *in vitro* bağırsak modelinde tutunmasını engelleme özellikleride belirlenmiştir. İzolatlar bağırsak epitel hücrelerinde *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* Tip I ve *Salmonella enterica* serotype Enteritidis'e karşı yüksek tutunma oranı göstermezken, sağlıklı yetişkin bireylerin bağırsak florasında sıklıkla bulunmayan *Listeria monocytogenes* ve *Clostridium difficile* patojenlerine karşı yüksek tutunma yüzdeleri vermişlerdir.

Anahtar Kelimeler: Probiyotik, Ekzopolisakkarit, Kolesterol asimilasyonu, Bağırsak epitel hücresi,

2018, 124 sayfa

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

INVESTIGATION OF SOME PROBIOTIC PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM NATURAL SOURCES AND DETERMINATION OF THEIR ABILITY TO PREVENT PATHOGENIC ATTACHMENT IN INTESTINE MODEL

Duygu ALP

Süleyman Demirel University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hakan KULEAŞAN

The aim of this study was to isolate lactic acid bacteria from various foods and plants provided from different cities and determine of these bacteria, probiotic feature and adherens properties of their ability to prevent pathogenic attachment in intestine model determination of adherens properties of lactic acid bacteria and their ability to prevent pathogenic attachment in intestine model. Sixty-nine lactic acid bacteria isolated for this purpose and low pH, pepsin, pancreatin, bile salts, lysozyme, phenol resistance were determined. In addition, antibiotic resistance, exopolysaccharide production, cholesterol assimilation abilities and antimicrobial effects of strains were investigated. Gastrointestinal system resistance tests and isolation sources were consideration and 15 isolates were selected. Nine of the isolates were identified as exopolysaccharide producers and *Lactobacillus plantarum* DA255 strain was the highest exopolysaccharide producing strain with 11.9 mg/L Total cholesterol assimilation percentages of isolates ranged from 60.71 to 16.71%. *Leuconostoc lactis* DA268, which is not eps producer, has the highest assimilation with 60.71 %. Strains were selected for the *in vitro* intestinal model adhesion experiments were completed with the viability of 76.38 and 84.65%. In our study, the ability to prevent isolates from being adhesion against to *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* Tip I and *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis in vitro* intestinal cell was determined. Although Isolates weren't able to adhere against *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* Tip I and *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* which is found in intestinal epithelial cells they were able to adhere against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium difficile* pathogens which are often absent in healthy human intestinal flora.

Keywords: Probiotic, Exopolysaccharide, Cholesterol assimilation, Brush border

2018, 124 pages

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve önerileri ile bana yol gösteren, bilimsel çalışma disiplinini öğrenmemde ve akademik gelişimimde büyük emeği olan yardım ve desteğini her zaman hissettiğim değerli Danışman Hocam Doç. Dr. Hakan KULEAŞAN'a

Çalışmam sırasında öneri ve bakış açılarıyla önemli katkılarda bulunan Tez İzleme Komitesinin değerli üyeleri Sayın Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR ve Sayın Prof. Dr. Yasin TUNCER'e,

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi doktora eğitimim boyunca da desteğini hiç eksik etmeyen, her zaman yanımda olduğunu bildiğim ve hissettiğim canım annem Neşe ALP ve kızlarının eğitimini her şeyden önce tutan canım babam Mehmet Kani ALP'e

Abla, arkadaş, kardeş her durumda yanımda olan benim için en iyisini isteyen, karşılaştığım zorluklarda yanımda olan canım ablam Damla ALP'e

Doktora eğitimim boyunca yanımda olan bana manevi desteklerini eksik etmeyen tüm arkadaşlarıma,

Tezimi maddi olarak 4439-D1-15 no'lu proje ile destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Duygu ALP
ISPARTA, 2018

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Kalın bağırsak kesitinin SEM görüntüsü	5
Şekil 2.2. Bağırsağın tabakaları	5
Şekil 2.3. Sekretuar immün sisteme ait yolakların şematik gösterimi	7
Şekil 2.4. İnce bağırsağın alt bölgesinde, (jejunum/ileum bölümlerinde) bulunan bağırsak florasının bir canlandırması (Conrad ve Vlassov, 2015).	10
Şekil 2.5. Bağırsaklardaki mikrobiyota ve patojenler ile aralarındaki sinyal dağılımı	18
Şekil 2.6. Probiyotik mikroorganizmaların etki mekanizmaları	24
Şekil 3.1. Yıkama öncesi ve sonrası bağırsaklar	42
Şekil 3.2. Kesilerek petri kutularına alınan bağırsak parçaları	43
Şekil 3.3. Bağırsaklara uygulanan işlem basamakları sırası	44
Şekil 4.1. <i>Lactobacillus plantarum</i> DA218 ve <i>Lactobacillus fermentum</i> DA134 suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları	65
Şekil 4.2 Tulum peynirinden elde edilen izolatların antibiyotik dirençlilik sonuçları	69
Şekil 4.3. Sucuk örneklerinden elde edilen izolatların antibiyotik dirençlilik sonuçları	69
Şekil 4.4. Turşu örneklerinden elde edilen izolatların antibiyotik dirençlilik sonuçları	70
Şekil 4.5. Bitki örneklerinden elde edilen izolatların antibiyotik dirençlilik sonuçları	70
Şekil 4.6. Protein sentezini inhibe eden antibiyotiklere karşı izolatların sonuçları ...	71
Şekil 4.7. DNA replikasyonunu inhibe eden antibiyotiklere karşı izolatların sonuçları	71
Şekil 4.8. Hücre sentezini inhibe eden antibiyotiklere karşı izolatların sonuçları	72
Şekil 4.9. <i>L. plantarum</i> DA255 ve <i>L. coryniformis</i> DA263 izolatların oluşturduğu parlak, mukoz yapı	79
Şekil 4.10. Suşların test bakterileri üzerine genel inhibisyon etkileri	88
Şekil 4.11. <i>Lactobacillus plantarum</i> DA140 suşunun bağırsak hücrelerine tutunma taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüsü	96
Şekil 4.12. <i>Lactobacillus casei</i> DA4 Suşunun Tutunma Yüzdeleri	98
Şekil 4.13. <i>Weisella cibaria</i> DA28 Suşunun Tutunma Yüzdesi	98
Şekil 4.14. <i>Lactobacillus plantarum</i> DA100 Suşunun Tutunma Yüzdesi	98
Şekil 4.15. <i>Lactobacillus plantarum</i> DA140 Suşunun Tutunma Yüzdesi	99
Şekil 4.16. <i>Lactobacillus coryniformis</i> DA263 Suşunun Tutunma Yüzdesi	99

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Sık kullanılan probiyotik mikroorganizmalar	21
Çizelge 4.1. Uygulanan kültürel testler sonucunda elde edilen bulgular	47
Çizelge 4.2. Safra tuzuna karşı 0., 4., 24. saat sonundaki gelişime durumları ve canlılık oranları	51
Çizelge 4.3. Mikroorganizmaların pH 2’de 0., 1. ve 3. saat sonundaki sayıları ve canlılık oranları (%)	55
Çizelge 4.4. Mikroorganizmaların pH 3’de 0., 1. ve 3. saat sonundaki sayıları ve canlılık oranları (%)	57
Çizelge 4.5. Kültürlerin 3 mg/mL pepsin içeren pH 2.0 PBS tampondaki dirençlilik gelişimleri	60
Çizelge 4.6. Kültürlerin 3mg/mL pepsin içeren pH 3.0 PBS tampondaki dirençlilik gelişimleri	61
Çizelge 4.7. Kültürlerin 1mg/mL pankreatine karşı gelişim sonuçları	63
Çizelge 4.8. Kültürlerin antibiyotik dirençlilik sonuçları	66
Çizelge 4.9. İzolatların antibiyotik duyarlılık ve dirençlilik yüzdeleri	68
Çizelge 4.10. İzolatların 100 mg/L lizozime karşı canlılık düzeyleri	75
Çizelge 4.11. Moleküler tanısı yapılan suşların listesi	77
Çizelge 4.12. İzolatların % 0.3 fenole karşı canlılık sonuçları	78
Çizelge 4.13. İzolatların ürettiği EPS miktarları (mg/L)	79
Çizelge 4.14. İzolatların kolesterol asimilasyon yüzdeleri ve miktarları	82
Çizelge 4.15. Laktik Asit Bakterilerinin 2. ve 5. saat sonundaki otoagregasyon yüzdeleri	83
Çizelge 4.16. Laktik Asit Bakterilerinin 2. ve 5. saat sonundaki koagregasyon yüzdeleri	84
Çizelge 4.17. Antimikrobiyal analiz sonuçları (mm)	87
Çizelge 4.18. LAB’nin ve patojen bakterilerinin sindirim sistemi modellemesi dayanımları	90
Çizelge 4.19. Laktik Asit Bakterilerinin bağırsak modelinde tutunma denemesi sonuçları	92
Çizelge 4.20. Patojen mikroorganizmalara karşı tutunma denemesi sonucu laktik asit bakterilerinin başlangıç ve 1. saat sonundaki % tutunma sonuçları	97
Çizelge 4.21. Laktik Asit Bakterilerinin patojenlerin tutunmasını engelleme denemesi sonuçları	100

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BSH	Safra Tuzu Hidrolaz Enzimi
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EPS	Ekzopolisakkarit
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
h	Saat
IgA	İmminoglobulin A
KDa	Kilodalton
kob	Koloni Oluşturan Birim
L	Litre
LAB	Laktik Asit Bakterileri
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
mL	Mililitre
MRS	Man Rogosa Sharpe
MRSA	Man Rogosa Sharpe Agar
NCCLS	National Committee For Clinical Laboratory Standarts
PBS	Fosfat Tamponu Çözeltisi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TCA	Triklor Asetik Asit
%	Yüzde
µL	Mikrolitre

1. GİRİŞ

Bağırsaklarımızda, içerisinde çeşitli türlerin bulunduğu trilyonlar düzeyinde mikroorganizma bulunmaktadır (Serino vd., 2009; Sears, 2005). Sağlıklı bir insanda bağırsak florasını oluşturan bakterilerin % 98'i faydalı olup, sindirime yardımcı fonksiyon görürler. Bu ilişki simbiyotik bir ilişkidir. Bakteriler en çok kalın bağırsakta bulunur. Bu bakterilerin işlevleri; sindirime yardımcı olmak, hücre büyümesini teşvik etmek, zararlı bakterilerin çoğalmasını önlemek, bağırsaklardan kana toksik ürünlerin geçişini engellemek, bağırsak florasında inflamasyonu engellemek, cilt hastalıklarının oluşumunu azaltmak, kişinin bağışıklık sistemini güçlendirmek, patojen mikroorganizmaları yok etmek, patojen olmayanlara karşı bağışıklık sisteminin aşırı tepki vermesini önlemek (alerji) vb. olarak sayılabilir (Koca, 2015).

Gastrointestinal mukozada mevcut olan tüm koruyucu mekanizmalara rağmen insanlar, zaman zaman bakteri ve virüsleri de içeren enterik patojenlere maruz kalmaktadırlar. Gastrointestinal sistem kompleks mikroorganizma topluluğuna sahip olup, sistemde mikroorganizma dağılımı da farklılık göstermektedir (Neish, 2002; Walter, 2008; Montalto, 2009). Özellikle, bağırsakta bulunan mikroorganizmalar konakçıyla etkileşime girerek, patojenler tarafından kolonileşmeyi önleme, besinsel bileşikleri düşürme, besin maddeleri üretme ve normal mukoza bağışıklığını geliştirme ve sürdürme gibi çeşitli işlevlere katkıda bulunurlar. Mide asiditesi, etkili bağırsak motilitesi, bağırsak proteolitik enzimleriyle bakterilerin tahrip edilmesi, bağırsakta üretilen immünoglobulin A (IgA)'nın geniş salınımı gibi mekanizmalar ile etkili bir bağışıklık sistemi sayesinde bakteri-konak dengesi sağlanmaktadır. Bu kontrol mekanizmaları değiştiğinde, kommensal bakteri sayısı düşerek patojen özellikler gösteren bakteri sayısında artış olabilir, bu da bağırsak hastalıklarının başlangıcı ve ilerlemesi ile sonuçlanır (Ojetti, 2009).

Bazı laktik asit bakterileri (LAB) doğal olarak asidofilik organizmalardır (büyüme pH optimum 3.5 ile 6.5) ve buldukları ortama adapte olarak dayanabildikleri asidik pH'larını daha da iyileştirebilmektedirler. LAB patojen bakterilerin kolonizasyonunu önleme, toksinlere ve endojen kaynaklı mutajenik moleküllere karşı baş etme yeteneklerine sahip oldukları için probiyotik olarak tercih edilmektedirler (Hove vd.,

1999; Pessione vd., 2012). Gastrointestinal sistemde enterik patojenler, sistemde var olan bakteri popülasyonunun üstünde bir yoğunlukta nüfuz ederek enfeksiyon oluştururlar (Sekirov vd., 2010). Bu nedenle probiyotik özellik gösteren bakterilerin bağırsak mukozasına tutunabilmesi ve kolonize olabilmesi önem taşımaktadır. Dolayısı ile probiyotik mikroorganizma seçimi yapılırken bağırsaklara tutunma yeteneği yüksek olan mikroorganizmalar tercih edilmektedir (Ouweland ve Salminen 2003; Bermudez-Brito vd., 2012). Probiyotik mikroorganizmaların en önemli grubunu oluşturan LAB içerisinde *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleri en yaygın olarak kullanılanlarıdır (Uymaz, 2010; Varsha vd., 2014).

Probiyotik mikroorganizmalar, bağırsak epiteline tutunma, patojenlerin kolonizasyonunu azaltma, bağışıklık sistemini uyarma, zarar gören mukozanın iyileşmesini arttırma ve bağırsaklardaki kolonizasyon sayesinde gastrointestinal hastalıkları önleme gibi özellikleri bakımından önemlidirler (He vd., 2001). İnsanlardaki *in vivo* bakteriyel adezyon çalışmalarında yer alan zorluklar nedeniyle potansiyel probiyotik suşların ön seçimi için *in vitro* model sistemler geliştirilmiştir. Bu sistemlerde düşük pH, pepsin, pankreatin, safra tuzları, lizozim gibi sindirim sisteminde bulunan bazı enzim ve bileşenlere karşı suşların dayanıklılıklarının yanı sıra bağırsak epitel hücrelerine tutunma yetenekleri de test edilmektedir (Kos vd., 2003). Bakteriyel tutunma, başlangıçta iki yüzey arasındaki spesifik olmayan fiziksel etkileşimlere dayanmakta daha sonra adezinler (genellikle proteinler) arasındaki belirli etkileşimler ve tamamlayıcı reseptörler sayesinde gerçekleşmektedir. Bu nedenle probiyotik suşların otoagregasyon ve bağırsak epitel hücrelerine tutunma yetenekleri de test edilmektedir (Kos vd., 2003; Meng vd., 2017). Antibiyotiklerin enfeksiyon tedavisinde kullanılmaya başlanmasıyla birlikte antibiyotiklere karşı direnç gelişimi sorun olmaya başlamıştır. Bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde (özellikle ampirik tedavide) antibiyotik seçiminin doğru yapılabilmesi için bölgesel antibiyotik dirençlerindeki özelliklerin ve değişimlerinin yakından izlenmesi önemlidir (Çetin vd., 2006). Antibiyotikler çiftlik hayvanlarında, evcil hayvanlarda ve balık yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca penisilin, sefalosporin ve diğer beta laktam grubu antibiyotikler çiftlik hayvanlarında büyümeyi desteklemek amacıyla da kullanılmaktadır. Antibiyotiklerin özellikle çiftlik hayvanlarında tedavi ve büyümeyi arttırmak amacıyla kullanılması halk sağlığı açısından önemli bir risk oluşturmaktadır. Antibiyotik dirençliliği, antibiyotik direnci

olan bakterileri içeren gıdaların tüketilmesi ve direncin diğer mikroorganizmalara transferiyle de yayılabilmektedir. Antibiyotiklere direnç kazanmış bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarda, hastalar tedaviye cevap vermediğinden vakaların çoğu ölümlerle sonuçlanmaktadır. Ayrıca dirençli bakteriler hastaların hastanede kalma süreleri ve tedavi giderlerinin artmasına neden olmaktadır (Şen ve Özdemir, 2016). Yakın zamanda probiyotik özellik göstermeleri açısından da önemli olan laktobasiller için antibiyotik direnç profilleri belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda genellikle vankomisine dirençli, penisilin ve ampisiline (hücre duvarı sentez inhibitörü) ise duyarlı olduklarını göstermiştir. Çoğu laktobasilin, glikopeptid antibiyotik tiplerine dirençli olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, vankomisine karşı direncin doğal direnç olabileceği de düşünülmektedir. Laktobasiller genelde kloramfenikol, eritromisin ve klindamisin (protein sentezi inhibitörleri) karşı duyarlıdır. Laktobasiller arasında tetrasiklin, neomisin, kanamisin, streptomisin ve gentamisin (aminoglikozit) karşı dirence de sıklıkla rastlanmaktadır. Bugüne kadar laktobasillerde en sık rastlanan direnç genlerinden ikisi, tetrasiklin direnci için tet (M), eritromisin direnci için erm (B) genleridir (Fukao vd., 2012). Örneğin antibiyotik tedavisine bağlı gelişen kalın bağırsağın enfeksiyonu olan Psödomembranöz kolit hastalığı bağırsaktaki normal bakterilerin antibiyotik ile popülasyonunun azalması ve bunun yerine patojen bir mikroorganizma olan *Clostridium difficile*'nin aşırı çoğalması ile oluşur. Her antibiyotik *C. difficile* kolitine neden olabilir ancak klindamisin, ampisilin ve sefalosporinler en çok sorumlu olanlardır (Geçim, 2005).

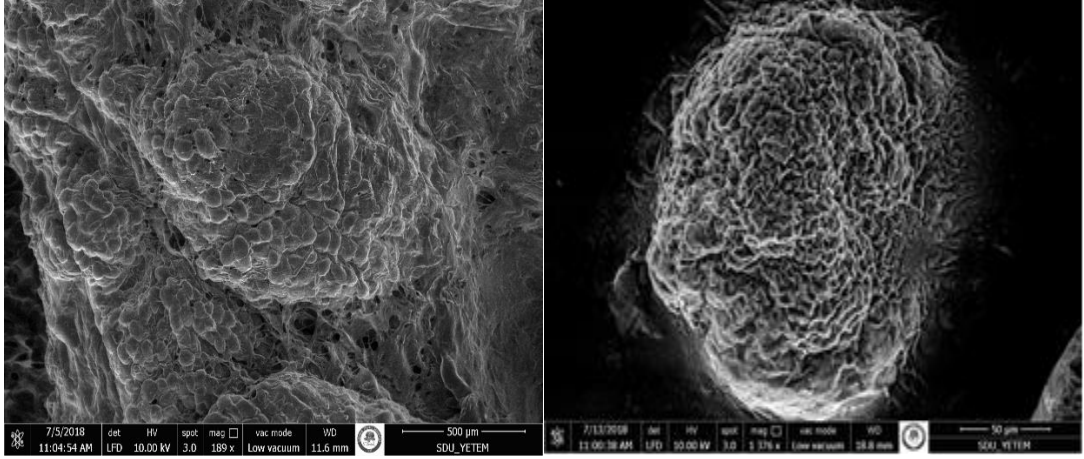
Ülkemizde ve dünyada probiyotik özellik gösteren suşların seçimi ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmada özellikle ülkemizde yapılan diğer çalışmalardan farklı olarak *in vitro* denemeler ile gastrointestinal sistemden canlı olarak geçebileceği belirlenen bazı suşların bağırsaklarda tutunma denemesi hücre kültürleri (Caco-2 vb) yerine taze kesilmiş koyun bağırsağı kullanılmıştır. Daha önce yapılmış çalışmalara katkı sağlaması amacıyla yapılan bu tez çalışmasında farklı illerden temin edilen çeşitli peynir, turşu, fermente sucuk ve bitki örneklerinden izole edilen LAB'nin *in vitro* denemeler ile sindirim sisteminden geçebilme yetenekleri, antibiyotik direnç/duyarlılık profilleri, patojenler üzerindeki antimikrobiyal etkileri ile kalın bağırsakta tutunma yeteneklerinin belirlenmesine çalışılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

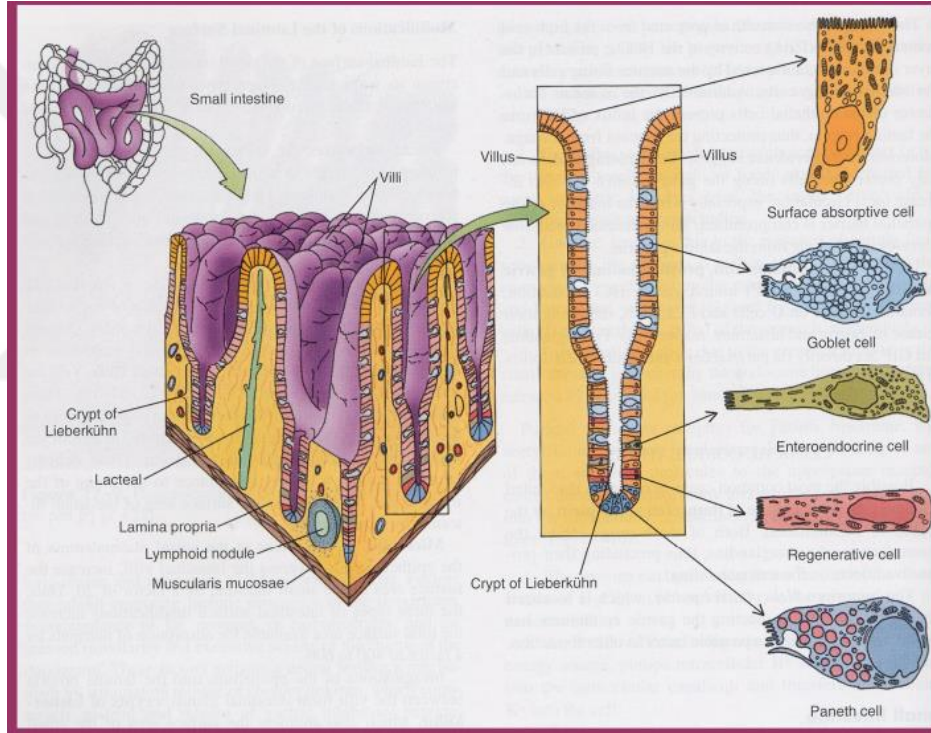
2.1. Bağırsak Epitel Yapısı ve Fizyolojisi

Beslenmede hayati görevleri bulunan ince bağırsak aynı zamanda insan vücudundaki en büyük endokrin organıdır. Enfeksiyonlara karşı oldukça iyi bir savunma gücü bulunan ve bağışıklık sisteminde rolü olan organların en önemlilerindedir. Ayrıca sindirim görevinden sorumlu mukozal yüzey alanı neredeyse sınırsız derecede geniştir. İnce bağırsak duodenum, jejunum ve ileum olmak üzere üç anatomik bölüme ayrılır. Kalın bağırsak ise insanda yaklaşık 90-150 cm uzunluğunda ileumdan rektuma kadar uzanan kısımdır. Sindirim artıklarının deposu ve iletim kanalı olmaktan başka suyu, sodyum ve kloru emmesidir. Potasyum, bikarbonat ve mukus salgılar böylece bazı karbonhidratların ve proteinlerin sindirimi için ve K vitamini üreten bakteriler için gerekli ortamı sağlar (Geçim, 2005)

Bağırsak duvarı Seroza, muskulariz, submukoza ve mukoza olmak üzere dört tabakadan oluşur. Seroza; en dış tabakadır, tek sıra yassı mezotelyal hücrelerden meydana gelmiştir. Muskulariz; dışarıda ince bir longitudinal (uzunlamasına) düz kas tabakası ve içeride daha kalın bir sirküler (dairese) düz kas tabakasından oluşmuştur. Kalın bağırsakta bu uzunlamasına kaslar üç düz banta ayrılır. Kas hücre membranları üzerindeki özel geçitler, hücreler arası ilişkiye olanak sağlar ve bu sayede kas tabakası elektriksel bir uyum içerisinde çalışır. Submukoza; kan damarları ve sinirler içeren fibroelastik bir bağ dokusu tabakasıdır. Mukoza ise ince bağırsaklarda emilim yüzeyini arttıracak şekilde oluşmuş mükemmel bir yapıya sahiptir. Lümeneye doğru uzanan parmaklı villöz çıkıntılar, hücre yüzeyini örten mikrovilluslar (firçamsı kenarlar) ve mikrovillusların üzerini örten glikokaliks tüyler, lümen içeriği ile ilişki içerisinde olan yüzey alanını inanılmaz bir biçimde arttırırlar. Kalın bağırsak ise farklı olarak villüs içermez. Mukoza; Muskulariz mukoza, Lamina propria ve Epitelyum olmak üzere üç tabakaya bölünebilir (Ulukaya, 1997; Geçim, 2005). Şekil 2.1'de bu çalışma kapsamında çekilen kalın bağırsak kesitinin SEM görüntüsü, Şekil 2.2'de bağırsağın tabakaları verilmiştir.



Şekil 2.1. Kalın bağırsak kesitinin SEM görüntüsü



Şekil 2.2. Bağırsağın tabakaları (Söke, 2017)

En derinde bulunan Muskulariz mukoza, Mukozayı Submukozadan ayıran ince kas tabakasıdır. Plazma hücreleri, lenfositler, makrofajlar, fibroplastlar, düz kas hücreleri ve hüresel olmayan bağ dokusu elemanlarını içerir. Lamina propria ise Epitelyum ve Muskulariz mukoza arasında yer alır, epitelyal tabakayı üzerinde taşır ve bu tabakayı aşan mikroorganizmalar ile savaşarak savunmada görev alır. Plazma hücreleri immün globulinlerin aktif olarak sentezlendiği alanlardır. Ayrıca yine Lamina propriada bulunan hücreler, epitelin çeşitli hüresel fonksiyonlarını

düzenleyen mediyatörler de (sitokinler, arasıdonik asit metabolitleri ve histamin gibi) salgırlar (Ulukaya, 1997; Geçim, 2005).

En içte yer alan Mukoza tabakası, villus ve Lieberkühn kriptalarını (salgı yapan küçük bezler) kaplayan tek katlı ve kalın epitel hücrelerinden meydana gelmiştir. Kript (salgı yapan hücrelerin çevrelediği küçük boşluk) epitelinin görevleri; hücre yenilenmesi, sıvı-elektrolit sekresyonu, endokrin ve ekzokrin salgıların sekresyonudur. Villöz epitel ise sindirim ve emilimden sorumludur. Kalın bağırsakta çok sayıda Lieberkühn kriptaları bulunur ayrıca kalın bağırsakta epitel hücreleri hemen hemen hiç enzim içermezler, bunun yerine sadece mukus salgılayan mukoz hücreler içerirler (Çavuşoğlu, 2001). Paneth hücrelerinin lizozim ve konak mukozal savunma sistemi ile ilişkili olduğu düşünölmektedir. Farklılaşmamış epitel hücreleri ile bağırsak epitelinin hızla yenilenmesini sağlayarak hücre yenilenmesinde görev alırlar. Yaşlı hücreler lümene atılırken, yeni hücreler kriptlerin içinden düzenli bir sıra ile hareket ederek onların yerlerini alırlar (Geçim, 2005).

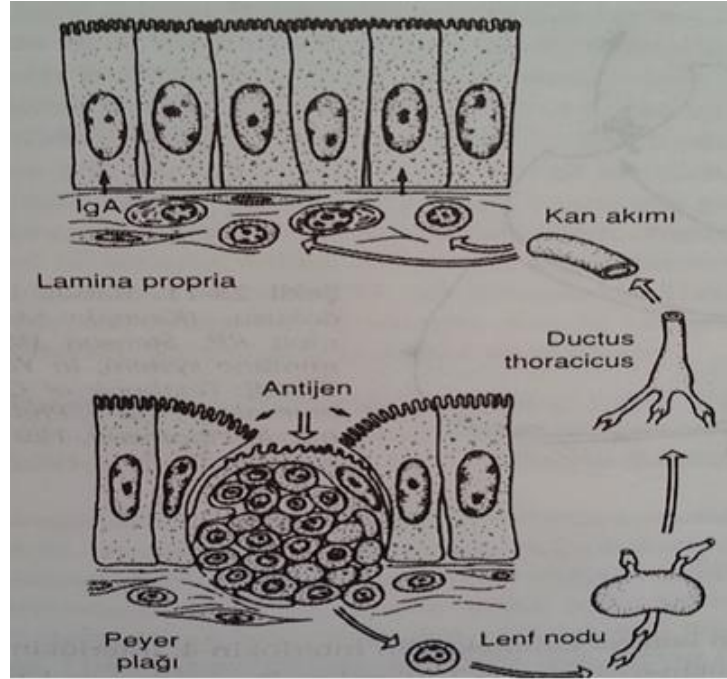
2.2. Mide Bağırsak Sisteminde Bağışıklık

İmmünite zararlı bir etkenin saldırısına karşı organizmada oluşan direnci ve bağışıklığı ifade etmek amacıyla kullanılmaktadır. İmmün sistem, fiziksel bariyerler, doğal immün sistem ve adaptif immün sistem tarafından oluşturulan savunma mekanizmalarını içeren bir yapıdır. İmmün sistemin ilk savunma hattı fiziksel bariyerlerdir. Bu bariyerler virüslere, bakterilere ve parazitlere karşı koruyucudur. Etkenin ilk önce bu bariyerleri geçmesi gereklidir. Genelde ilk ve en önemli savunma hattı, yaklaşık olarak 2 m² bir alana sahip olan cilt gibi gözökmekle birlikte, yaklaşık 400 m² mukus membranla kaplı olan sindirim, solunum ve üreme sistemindeki alanlar, mukozal immüniteyi oluşturması bakımından çok önemli rol oynamaktadır (Baştürk ve Boyacıoğlu, 2005).

2.2.1. Bağırsağın Bağışıklık Sistemindeki Fonksiyonu

İnsan vücuduna her gün gıdalarla birlikte çok sayıda bakteri, parazit ve virüs girmektedir. Bunların sadece bir kısmı patojeniktir ancak bağırsağın geniş mukozal yüzeyi büyük bir giriş kapısıdır. Sekretuar immün sistem bağırsak savunmasının

önemli bir elemanı olarak bakterilerin çoğalmasını engelleyen, virüsleri nötralize eden ve enterotoksinlerin penetrasyonunu azaltan özel bir antikor üretir. Bu antikor sekretuvar imminoglobulin A (IgA) olarak adlandırılmaktadır. İnce bağırsak, IgA'nın önemli kaynaklarından birisidir. İnce bağırsakta bulunan lamina propria hücreleri, IgA üreten plazma hücrelerini üretirler. İnce bağırsak bariyerini geçen antijenler, lenf nodüllerinde, antijenlerin IgA üreten lenfoblastlara sunulması için özelleşmiş M hücreleri ile karşılaşılır. Antijen ile karşılaşan lenfoblastlar sistemik dolaşıma katıldıkları bölgesel lenf nodlarına göç ederler, daha sonra da Lamina propriada yaygın olarak buldukları bağırsağa geri dönerler. Lamina propriada absorbe edilmiş antijenlere karşı özel IgA antikorları üreten plazma hücrelerine dönüşürler. Bu IgA antikorları protein yapıda bir taşıyıcı aracılığı ile epitel hücreleri üzerinden ince bağırsak lümenine geçerler. Bu taşıyıcı IgA'yı taşımanın yanı sıra hücre içi lizozomlardan da korur. Hücrenin serbest yüzeyinde yer alan antikorlar glikokaliks içinde birikirler. Yeni antijenlerle savaşmak için stratejik bir pozisyona sahiptirler ve antijenlerin hücre zarına tutunmalarını engellerler. Canlı bakterilerin sağlam gastrointestinal sistemden mezenterik lenf nodları ve ötesine geçmeleri bakteriyel translokasyon olarak isimlendirilir (Geçim, 2005). Şekil 2.3'de Sekretuvar immün sisteme ait yolların şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.3. Sekretuvar immün sisteme ait yolların şematik gösterimi (Geçim, 2005)

Birçok farklı hücre tipini içeren doğuştan ve adapte immün sistemde özellikle epitel ve mezenkimal hücreler sürekli bağırsak lümeninde, Epitelyumda ve Lamina propriada mikroorganizmalar ile etkileşim içerisinde. Doğuştan gelen bağışıklık, mikroorganizmalara karşı daha önce bir temas olmamasına karşı koruma sağlar. Bu savunma mekanizması, mikroorganizmaların epitel hücre tabakasının apikal yüzeyine (epitel hücresinin serbest ya da bağlanmamış yüzeyi) erişmesini önlemeyi amaçlamaktadır. Bu sayede derin dokulara girmeye karşı ilk fiziksel engel oluşturulmaktadır. Bağırsak epitel hücreleri, Lamina propria olarak bilinen birleşik doku tarafından desteklenir ve bağırsak florasını içeren iç kısım ile lümeni (dış bölme) ayıran tek bir hücre tabakasını oluşturmalarının yanı sıra sıkı bağlarla bağlanarak fiziksel bir bariyer oluştururlar. Ayrıca bağırsak epiteli mikrovillileri de, mikroorganizmaların bağırsağa tutunmasını engelleyerek epitel hücrelerin bariyer fonksiyonuna destek olan önemli yapılardan birisidir (Magalhaes vd., 2007).

2.3. Bağırsak Yapısı ve Mikrobiyotası

Bağırsaklarımızda, içerisinde çeşitli türlerin bulunduğu trilyonlarca mikroorganizma bulunmaktadır. Türlerin büyük çoğunluğu fizyolojiye ne faydalı ne de zararlıdır ve işlevleri kesin olarak bilinmemektedir (Sears 2005; Serino vd., 2009). Bakteriler, arkealar, virüsler ve belirli bir çevrede yaşayan bazı tek hücreli ökaryotların da dahil olduğu bu mikroorganizmalar topluluğuna "normal flora" veya "mikrobiyota" denir (D'Argenio vd., 2015).

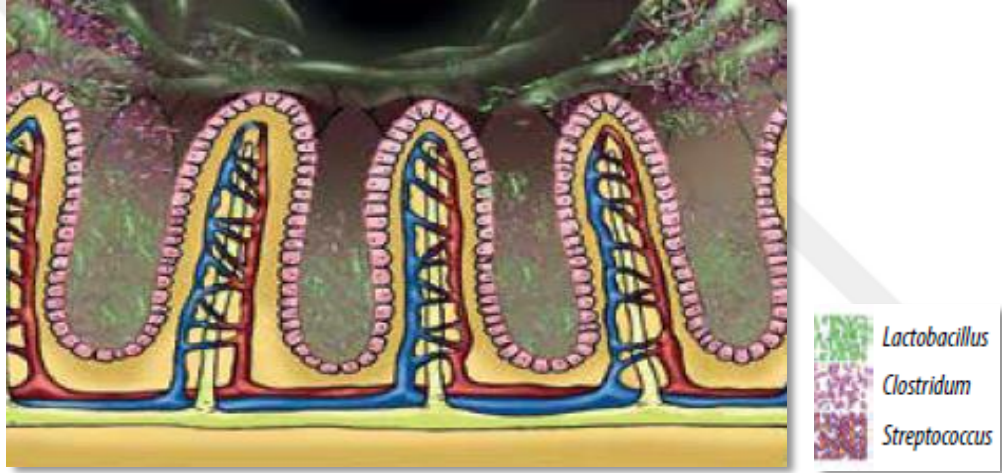
Doğumda insan kalın bağırsağı sterildir ancak saatler içinde bağırsaklar ağızdan anüse kadar kolonize olur. Kalın bağırsaktaki baskın bakteri *Bacteroides*'e doğumdan 10 gün sonra rastlanır, 3-4 hafta sonra ise karakteristik bağırsak florası yerleşmiş olur ve yetişkin hayata kadar o şekilde kalır. Kalın bağırsak feçes kuru ağırlığının 1/3'ünü oluşturan yoğun bakteri popülasyonunu barındırır. Bağırsak bakterileri patojenik bakterileri baskırlar, ince bağırsaktan sindirilmeden geçen karbonhidrat ve proteinlerin yıkımında önemli rol oynarlar. Enterohepatik dolaşım ile yeniden kazanılan bir çok maddenin (bilirubin, safra asitleri, östrojen, kolesterol) metabolizmasında görev alırlar ve K vitamini gibi gerekli maddeleri üretirler (Geçim, 2005).

Sağlıklı bir insanda bağırsak florasını oluşturan bakterilerin % 98'i faydalı olup, sindirime yardımcı fonksiyon görürler. Bu ilişki simbiyotik bir ilişkidir. Bakteriler en çok kalın bağırsakta bulunur. Büyük çoğunluğu anaerob olan bu bakterilerin % 30'unu *Bacteroides* türü oluşturur. *Bacteroides* türü bakteriler yüzey antijenlerini değiştirerek kendilerini konak hücreye benzetirler, bu sayede bağışıklık tepkisinden kurtulurlar. Bu bakterilerin işlevleri; sindirime yardımcı olmak, hücre büyümesini teşvik etmek, zararlı bakterilerin çoğalmasını önlemek, bağırsaklardan kana toksik ürünlerin geçişini engellemek, bağırsak florasında inflamasyonu engellemek, cilt hastalıklarının oluşumunu azaltmak, kişinin bağışıklık sistemini güçlendirmek, patojen mikroorganizmaları yok etmek, patojen olmayanlara karşı bağışıklık sisteminin aşırı tepki vermesini önlemek (alerji) vb. olarak sayılabilir (Koca, 2015).

Gastrointestinal sistem en büyük ve en kompleks mikroorganizma topluluğuna sahiptir. Gastrointestinal sistemde mikroorganizma dağılımı da farklılık göstermektedir (Neish, 2002; Walter, 2008; Montalto, 2009). Midenin duodenuma açıldığı yer (pilor), yabancı cisimler ve tümör gibi nedenlerle kısmi veya tam olarak tıkalı olmadığı normal koşullarda mide asiditesi midede mikroorganizma sayısını minimumda tutar (10^3 - 10^5 bak./g). Jejunum ve ileumda bu sayı 10^4 - 10^8 kob/ml olmaktadır. En yüksek sayı ise 10^{14} kob/ml ile kalın bağırsaktadır. Bağırsak florası yaklaşık 800 farklı bakteri cinsi, 7000'in üzerinde suş içermektedir (Neish, 2002; Walter, 2008; Montalto, 2009). Kalın bağırsakta feçesin milimetresinde *Bacteriodes* cinsleri 10^{11} - 10^{12} kob/g oranında bulunurken *E. coli* ise 10^8 - 10^{10} kob/g arasında bulunur (Geçim, 2005).

Gastrointestinal sistemde en yaygın olarak rastlanan anaerobik bakteri cinsleri *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium* ve *Lactobacillus* iken aerob Gram negatif bakterilerden ise *Escherichia coli* ve *Salmonella* spp.'dir. Gram pozitif koklardan yaygın olarak *Enterococcus*, *Staphylococcus* ve *Streptococcus*, aerobik mayalardan *Candida* bulunur (Neish, 2002; Montalto, 2009). Ayrıca koliform grup bakteriler ve *Proteus* cinsi bakteri türlerine de rastlanmaktadır. Gastrointestinal sistem bir bütün olarak ele alındığında, doğal biota içerisinde yer alan mikroorganizmalar arasında mide için *Helicobacter pylori*, kalın bağırsak için *Bacteroides* türleri yüksek oranda hastalığa neden olabilmektedir (Ustaçelebi, 1999).

Özellikle, bağırsakta bulunan mikroorganizmalar konakçıyla etkileşime girerek, patojen kolonizasyonunu önleme, rekabet vasıtası ile besin bileşiklerini düşürme, organik asit sentezi ve normal mukoza bağışıklığını geliştirme ve sürdürme gibi çeşitli işlevlere katkıda bulunurlar. Mide asiditesi, etkili bağırsak motilitesi, bağırsak proteolitik enzimleriyle bakterilerin tahrip edilmesi, bağırsakta üretilen IgA'nın geniş salınımı gibi mekanizmalar ile etkili bir bağışıklık sistemi sayesinde bakteri-konak dengesi sağlanmaktadır. Bu kontrol mekanizmaları değiştiğinde, kommensal bakteri sayısı düşerek patojen özellikler gösteren bakteri sayısında artış olabilir, bu da bağırsak hastalıklarının başlangıcı ve ilerlemesi ile sonuçlanır (Ojetti, 2009). Aşağıda Şekil 2.4'te ince bağırsağın alt bölgesinde (jejunum/ileum bölümlerinde) bulunan bağırsak florasının bir canlandırması verilmiştir. Üç temel tür (*Lactobacillus*, *Clostridium*, *Streptococcus*) baz alınmıştır.



Şekil 2.4. İnce bağırsağın alt bölgesinde, (jejunum/ileum bölümlerinde) bulunan bağırsak florasının bir canlandırması (Conrad ve Vlassov, 2015).

Bağırsak florası kişiden kişiye değişiklik göstermekle beraber doğumdan sonra birkaç yıl içerisinde şekillendiği düşünülmektedir (Berg, 1996; Serino vd., 2009). Bağırsak kolonizasyonu doğumdan itibaren başlamaktadır (Mackie 1999; Serino vd., 2009). Anneden ve çevreden gelen mikroorganizmalar, yenidoğanda gastrointestinal sistemde kolonize olarak floranın gelişmesini sağlarlar. Yenidoğan florası ilk yıllarda hızla değişirken ilerleyen yıllarda durağanlaşma göstermektedir. Bu ilk yıllardaki oluşan flora sağlıklı bir bağırsak florası için çok önemlidir (Mackie 1999; Serino vd., 2009; D'Argenio vd., 2015; Murphy vd., 2017). Anne sütü ile beslenen çocuklarda bağırsaklarda *Lactobacillus* ve *Streptococcus* cinsi bakteriler yoğun olarak bulunur (Ustaçelebi, 1999; Pessione, 2012). Beslenme alışkanlıkları, bağırsak florasının

oluşumunda belirgin etkiye sahiptir. Bağırsak florasında bulunan mikroorganizma türleri hafif bazik ortamları tercih etmektedirler, bundan dolayı ortam pH'sı bazikleştikçe kalıcı flora dereceli olarak artar, ishal durumunda ise bağırsakta bulunan bakteri sayısı büyük oranda düşer (Ustaçelebi, 1999).

Mikrobiyal flora iki grupta ele alınmaktadır. Birincisi, kalıcı flora olarak adlandırdığımız belirli bölgelerde genellikle değişmeyen, kısa süreli olarak ortamdaki uzaklaştırıldıkları durumlarda bile yeniden gelişebilen, süreklilik gösteren mikroorganizma topluluğunun oluşturduğu floradır. Bu florada yer alan mikroorganizmalar besinlerin absorpsiyonunda rol alırlar ve mukozada patojen bakterilerin kolonizasyonunu azaltırlar. Ayrıca bakteriyosin üreterek bazı bakterilerin üremesini engellerler. İkincisi ise geçici floradır. Geçici flora, kalıcı floranın yanında, bazen patojen de bulundurabilen, değişik sürelerde bağırsak ortamında kalan, çoğu hastalık oluşturmeyen mikroorganizma topluluğundan oluşmaktadır. Ancak kalıcı flora üyeleri ortadan kalktığında, geçici flora kolonize olabilmekte ve hastalık yapıcı özellik kazanabilmektedir (Ceyhan ve Alıç, 2012).

Bazı bakteriler karbonhidratların sindirimi, folik asit, biotin ve K vitamini sentezi gibi özellikler taşımaktadırlar. Bu bakteriler içerisinde en bilinenleri *Lactobacillus* türüne ait olanlardır (Zoetendal, 2006; O'Hara, 2006; Serino vd., 2009). Bu gibi bakteri kolonileri potansiyel olarak patojenik bakterilerin büyümesini (genellikle rekabetçi dışlama yoluyla) engellemektedir. Bu nedenle bu "iyi" bakterilerin bir kısmı probiyotik diyet takviyeleri olarak kullanılmaktadır (Salminen, 2005). Bazı bakterilerin konakçı bünyesinde bağışıklık modülasyonu, ilaç metabolizması, gastrointestinal kanal motilite regülasyonu, mukozal bariyer takviyesi, kan damarlarının oluşumu, bağırsağın iç dengesinin sağlanması ve postnatal (doğum sonrası) bağırsak olgunlaşması gibi fonksiyonları bulunmaktadır (Ouweland, 2002; Serino vd., 2009).

2.4. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri

Laktik asit bakterilerinin (LAB) sağlık üzerindeki olumlu etkileri ilk kez 1900'lu yılların başında Rus bilim adamı Metchnikoff tarafından belirlenmiştir. Metchnikoff, fermente süt ürünlerinin vücutta bulunan toksik maddelerden dolayı zehirlenmeyi

engellediğini öne sürmüştür (Sağlam, 2013). Orla-Jensen 1919'da LAB hakkında monografi yayınlamış ve LAB'nin sistematik olarak tanımlanmasına büyük katkısı olmuştur (Axelsson, 1989). Günümüzde LAB'nin sınıflandırılmasında farklı morfolojileri, glukozu fermente edebilmeleri, farklı sıcaklıklarda gelişebilmeleri, laktik asit üretim şekilleri, yüksek tuz konsantrasyonunda gelişimleri ve asit veya alkali toleransları gibi özellikleri kullanılmaktadır (Pilar vd., 2008). Taksonomileri revize edilmiş olsa da Orla-Jensen tarafından yayınlanan bu karakterizasyon halen geçerliliğini korumaktadır (Axelsson, 1989).

LAB, Gram pozitif, fakültatif anaerob, katalaz negatif, birkaç üyesi dışında hareketsiz, sitokromdan içermeyen, spor oluşturmeyen, karbonhidrat fermantasyonu sırasında son ürün olarak laktik asit üreten bakterilerdir. Farklı türleri olan LAB'nin sınıflandırılması; morfoloji (kok, çubuk veya tetrat), glikoz fermantasyonu (homo ve hetero-fermantasyon), çeşitli karbonhidratları kullanma özellikleri, farklı sıcaklıklarda gelişme (10-45°C), laktik asidin konfigürasyonu (D, L, DL), yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişme yeteneği ve asit veya alkali toleransı temellerine dayanır (Amann vd., 1995; Gürsoy vd., 2005; Sağlam, 2013).

LAB sitokromları ve porfirinleri üretebilme yeteneğine sahip olmadıkları için ATP 'yi sadece şekerlerin fermantasyonu ile elde ederler. Enerji üretimleri için oksijen gerekmediğinden dolayı anaerobik koşullarda iyi gelişim göstermektedirler. Ancak aynı zamanda birçok suş oksijen bulunan ortamda da iyi gelişebilmektedir (Stieglmeier vd., 2009). Laktik asit bakterileri, karbonhidratları homofermentatif ya da heterofermentatif yolla fermente edebilmekte ve laktik asit başta olmak üzere asetik asit, formik asit, etanol ve CO₂ üretebilmektedir (Gürsoy ve Kınık 2005).

Hekzosları fermente ederek laktat oluşturan bakteriler laktik asit bakterileri (LAB) olarak adlandırılırlar. Laktik asit fermantasyonları birçok gıdanın ekşimesine, bozulmasına yol açarlar. Diğer taraftan da pek çok gıdanın farklı bir ürün şeklinde ortaya çıkmasına, kendine özgü tat ve aroma kazanmasına (yoğurt ve peynir çeşitleri gibi) neden olurlar. Ayrıca kullanılan ham madde ve üretim teknolojisi için de laktik fermantasyonlar çok önemli role sahiptir. LAB hekzosların fermantasyonu sırasında früktoz di fosfat yolunu kullanarak sadece laktik asit (% 90-100) oluştururlarsa

homofermantatif, laktik asidin (% 50) yanı sıra etanol ve/veya asetat ile CO₂ de meydana getiriyorlarsa heterofermantatif olarak adlandırılırlar (Tunail, 2009).

2.4.1. Laktik Asit Bakterilerinin Bağırsaktaki Önemi ve Etkileri

Bağırsak mikrobiyotası çok istikrarlı bir ekosistem olmasına rağmen mevcut denge patojen bakteriler, virüsler ve antibiyotikler gibi bir çeşitli faktörler tarafından bozulabilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri ve Kuzey Avrupa'daki turistler genellikle dünyanın az gelişmiş bölgelerini ziyaret ederken turist ishali ile karşı karşıya kalırlar. Bu vakaların % 40-70'inde etiyolojik ajan enterotoksijenik *Escherichia*'dır (*E. coli*). Turist ishali büyük oranda profilaktik antibiyotik alımı ile engellenebilmektedir. Bu ajanların kullanılması antibiyotiklere dayanıklı bakteri jenerasyonlarının ortaya çıkmasına neden olabilir. Bu nedenle laktik asit bakterilerinin ve diğer probiyotiklerin enterik patojenleri inhibe ederek veya yok ederek gastrointestinal sağlığa olan katkıları araştırılmıştır. Kontrol grubu olmadan yapılan klinik gözlemlere dayanan çok sayıda yayında laktik asit bakterilerinin ishali önlemede/süresinin kısalmasında rolü olduğu belirtilmektedir (Hove vd., 1999). Bu amaçla yapılan bazı çalışmalar fermente süt ürünlerinin ve *L. casei* ile *B. bifidum* gibi mikroorganizmaların çocuk ishalinin önlenmesi ve/veya tedavisinde etkili olduğunu göstermiştir. LAB'nin antibiyotik tedavisi sonucu oluşan ishalin sıklığını azalttığı da bazı çalışmalar ile gösterilmiştir. Ancak bu çalışmalar sınırlı sayıdadır ve rutin olarak antibiyotik kullanan ve immün olarak baskılanmış hastalarda laktik asit bakterilerinin rolünü göstermektedir (Wedajo, 2015).

LAB'nin ishali azaltmadaki rolünün bağırsakta patojenler ile besin alma veya barsak alanında tutnma rekabeti yoluyla olduğu ya da *in vitro* bazı çalışmalarda elde edilen sonuçlara göre *L. casei*, *L. acidophilus* ve *L. bulgaricus* gibi LAB'nin patojenlerin gelişimini engelleyen bazı antimikrobiyal (asidofilin, bulgarikan vb.) maddeler üreterek olduğu görülmüştür. LAB'nin ishale karşı etkili olmasında bağışıklık sisteminin gelişmesinde etkili olmasının da rolü olduğu düşünülmektedir. Ayrıca LAB'nin insanlarda antijeni tanıyan B-lenfositlerini, bunların fagositoz aktivitelerini, antijeni yok etmeye yardımcı olan IgA, IgG ve IgM salgılayan hücreler ile antikor aktivitesini arttıracak serum IgA düzeylerini ve beyaz kan hücrelerinin hastalığa

karşı direnç göstermesine yardımcı olan γ -interferon düzeylerini artırma etkisine sahip olduğu düşünülmektedir (Wedajo, 2015).

Vücudun savunma sistemlerinden biri de bağırsağın mukus tabakalarının sağladığı engeldir. Mukoza fiziksel bir bariyer sağlar ve genellikle yabancı maddelerin bağırsaklardan geçmesini önler. Bağırsak mukozasında da çok çeşitli bağışıklık hücreleri bulunmaktadır ve bağırsağın bağışıklık sistemi ile etkileşime girmesine izin verir. Laktik asit bakterileri de, bağırsak mukozasında bağışıklık faaliyetini uyarabilme özelliğine sahiptirler (Perdigon,1993; Wedajo, 2015).

LAB mide geçişinde kolayca hayatta kalabilmelerinden dolayı bu mikroorganizmaları içeren yoğurt, kefir ve peynir gibi gıdalar, bağırsaklarda bulunan LAB popülasyonunu zenginleştirebilir. Bazı LAB, doğal olarak asidofilik organizmalardır (büyüme pH optimum 3.5 ile 6.5) ve hatta stratejiler geliştirerek dayanabildikleri asidik pH'larını daha da iyileştirebilmektedirler ("Et ve yağ" bakımından zengin diyetlerle beslenme ve kolon kanseri arasındaki ilişki *Clostridia*'nın safra asitlerini bağırsak mukozasının neoplastik transformasyonundan sorumlu olan kanserojen moleküllere metabolize etme özelliği ile kısmen açıklanabilmektedir). Dolayısıyla LAB'nin rolü, sadece patojen bakterilerin kolonizasyonunu önlemek değil, toksinlere ve endojen kaynaklı mutajenik moleküllere karşı da savaştır (Pessione vd., 2012). Bu özelliklerinin yanı sıra ince bağırsaklara ulaşabilen LAB'nin katkısı ile laktozun glikoz ve galaktoza parçalanması veya sindirilmesi hızlanabilmektedir (Hove vd., 1999).

2.4.2. Laktik Asit Bakterilerinin Epitel Yüzeye Tutunması ve Önemi

Gastrointestinal mukozada mevcut olan tüm koruyucu mekanizmalara rağmen insanlar, zaman zaman bakteri ve virüsleri de içeren enterik patojenlere maruz kalmaktadırlar. Gastrointestinal sistemde enterik patojenler, sistemde var olan bakteri popülasyonunun üstünde bir yoğunlukta nüfuz ederek enfeksiyon oluştururlar (Sekirov vd., 2010). Bu nedenle probiyotik özellik gösteren bakterilerin bağırsak mukozasına yapışabilmesi ve kolonize olabilmesi önem taşımaktadır. Dolayısı ile probiyotik mikroorganizma seçimi yapılırken bağırsaklara tutunma yeteneği yüksek

olan mikroorganizmalar tercih edilmektedir (Ouwehand ve Salminen 2003; Bermudez-Brito vd., 2012).

Probiyotik mikroorganizmalar, bağırsak epiteline tutunma, patojenlerin kolonizasyonunu azaltma, bağışıklık sistemini modüle etme, zarar gören mukozanın iyileşmesini arttırma ve bağırsaklardaki kolonizasyon sayesinde gastrointestinal hastalıkları önlenme gibi özellikleri bakımından önemlidirler. Örneğin mukozal *Lactobacillus* sayısının azalmasının Ülseratif Kolit ve Rotavirüs kaynaklı ishal olasılığını arttırabileceği düşünülmektedir (He vd., 2001). *Lactobacillus* cinsi bakteriler genelde hareketsizdirler ancak, flagellaya sahip bazı türleri hareket edebilmektedir. Bu hareketliliğin mikroorganizmaya toksik maddelerden sakınma ve uygun yere taşınma imkanı verdiği ve böylece ekosistemdeki diğer bakterilere nazaran üstünlük sağladığı düşünülmektedir (Eryılmaz, 2011).

Besleme ağırlıklı yapılan çalışmalarda probiyotiklerin insan bağırsak mukozasında sürekli olarak tutunamadığı, 1-2 hafta sonrasında feçeste bu mikroorganizmalara rastlanılmadığı görülmüştür. Bu nedenle probiyotiklerin kolonizasyon süreleri ön plana çıkmaktadır. Bağırsaklar bağışıklık sisteminde çok önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle suşların bağırsaklarda tutunabilme yeteneği ne kadar kuvvetli ise mikroorganizmanın probiyotik olma özelliği o kadar artmaktadır. Ayrıca probiyotik mikroorganizmaların, reseptörler için patojenlere göre daha yüksek afiniteye sahip oldukları zaman veya daha yüksek konsantrasyonlarda olduklarında, bağırsaklarda patojenlerin yerini alabildikleri gözlenmiştir. Örneğin yapılan bazı çalışmalarda, Laktobasillerin, hasar görmüş bağırsak dokusunun *E. coli* tarafından kolonizasyonuna engel olabildiği, kolonize olmadığında ise hasar görmüş dokunun *E. coli* ve diğer gram negatif bakteriler tarafından kolonize edildiği ve iyileşme süresinin uzadığı görülmüştür (Ouwehand ve Salminen, 2009). LAB, bağırsak epitel hücrelerine tutunmayı ve mukus ile etkileşimlerini çeşitli yüzey belirleyicileri ile sağlarlar. Probiyotiklerin, patojen mikroorganizmaları mukustan dışlayabilme yeteneğinin yine bu spesifik etkileşim ve yüzey proteinlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Bermudez-Brito vd., 2012).

Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucu arkea ve bakterilerde en yaygın yüzey yapılarından birinin 'yüzey proteini' veya 'S-katmanı' olarak adlandırılan, protein alt

birimlerinden oluşmuş monomoleküler diziler olduğu belirlenmiştir (Sara ve Sleytr, 2000). Hücre duvarının en dıştaki bileşeni olan S-katmanın molekül ağırlığı 40-200 kDa, kalınlığı ise 5–25 nm'dir. Elektron mikroskobu ile gözlemlendiğinde oblik, kare veya altıgen simetrisi oluşturan yapıya sahip olduğu görülmüştür (Sara ve Sleytr 2000; Frece vd., 2005; Johnson vd., 2013). Gram (+) ve Gram (-) bakterilerdeki S katmanı yapısı ile arkealarda bulunan yapı birbirinden farklıdır. Gram (+) bakterilerde peptidoglukan veya psödomurein ile bağlantılı iken Gram (-)'lerde lipopolisakkaritlere bağlanır. Tipik bir S-katmanı non-kovalent bağlarla bağlı, hücre çeperinin en dış yapısını oluşturan protein dizisi şeklinde olup asidik ve hidrofilik aminoasitlerden oluşmaktadır. Bu aminoasitler arasında en çok lizin, arjinin, histidin ve metionin bulunmaktadır. S-katmanının biyolojik fonksiyonları arasında; hücre koruması, hücre şeklinin belirlenmesi, moleküler ve iyon yakalama ile yüzeylere yapışma yer almaktadır (Wasko vd., 2014; Meng vd., 2017). S-katman proteini aynı zamanda virülans özelliklerin tanımlanması, kanser ve antialerjik adjuvan tedavilerde de sıklıkla kullanılmaktadır (Sara ve Sleytr 2000; Frece vd., 2005).

Yukarıda verilen özelliklere ek olarak bir bakteri hücresinin intestinal epitele tutunmasından sorumlu yapının S-katmanı olduğu düşünülmektedir. S-katmanı tekrar eden bir yapıya sahiptir ve bu tekrar eden yapı sayesinde bağlanmanın güçlendiği düşünülmektedir. Ayrıca bakteri yüzeyinin sıkı bir şekilde kaplanabilmesi için S-katmanı üretici genlerinin güçlü olması gerekir. Bu duruma örnek *L. acidophilus*'dur. S-katmanı üretiminden sorumlu 'laktaz dehidrogenaz' geni üretimini diğer mikroorganizmalardan farklı olarak iki kat fazla yapmaktadır (Sara ve Sleytr 2000; Frece vd., 2005).

Yapılan çalışmalar sonucunda S-katmanı ve benzeri adezinlerin membranlara bir lipit parçası yoluyla bağlandığı ya da hücre duvarına gömüldüğü belirlenmiştir (Goh ve Klaenhammer, 2010; Ossowski vd., 2011). Laktik asit bakterileri içerisinde S-katmanı proteinlerinin varlığı ve onları kodlayan genler özellikle *L. brevis*, *L. acidophilus*, *L. helveticus* ve *L. crispatus*'da tespit edilmiştir. Laktobasillerin yüzey proteinlerini genellikle çoğalmaları süresince ürettikleri ve insan kollajen proteinlerine bağlanma amacıyla kullandıkları, özellikle kollajen bağlayıcı proteinlerin, mikroorganizmaların spesifik bağlama kabiliyetini arttırdığı ve aynı

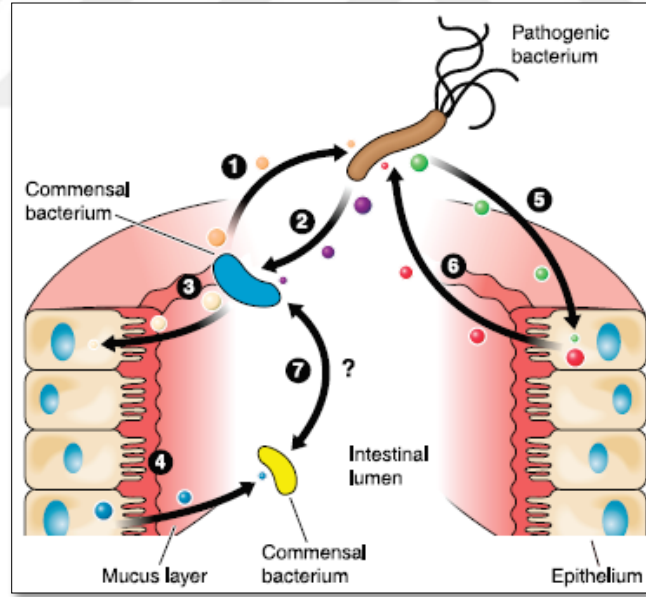
zamanda bu yüzey proteinlerinin bağırsak patojenleri ile rekabette önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Yadav vd., 2013).

İnsanlardaki *in vivo* bakteriyel adezyon çalışmalarında yer alan zorluklar nedeniyle potansiyel probiyotik suşların ön seçimi için *in vitro* model sistemler geliştirilmiştir. Bu sistemlerde düşük pH, pepsin, pankreatin, safra tuzları, lizozim gibi sindirim sisteminde bulunan bazı enzim ve bileşenlere karşı suşların dayanıklılıklarının yanı sıra bağırsak epitel hücrelerine tutunma yetenekleri de test edilmektedir (Kos vd., 2003). Bakteriyel tutunma, başlangıçta iki yüzey arasındaki spesifik olmayan fiziksel etkileşimlere dayanmakta daha sonra adezinler (genellikle proteinler) arasındaki belirli etkileşimler ve tamamlayıcı reseptörler sayesinde gerçekleşmektedir. Bu nedenle probiyotik suşların otoagregasyon ve bağırsak epitel hücrelerine tutunma yetenekleri de test edilmektedir. Yine sıkça belirlenen özelliklerinden birisi de koagregasyon kabiliyetleridir. Bu özellik patojen mikroorganizmalar tarafından kolonizasyonu önleyen bir bariyer oluşturabilme yeteneklerinin belirlenmesi bakımından önem kazanmıştır (Kos vd., 2003; Meng vd., 2017).

Agregasyon yeteneği, benzer hücrelerin kümeleşerek otoagregasyon oluşturması, farklı genetik materyalli hücrelerin koagregasyon oluşturmasına göre belirlenmektedir. LAB agregasyon özellikleri sayesinde bulunduğu yüzeye ve birbirlerine yapışarak bir bariyer oluşturabilirler (Kımet, 1997). Probiyotik bakterilerin agregasyon oluşturma yeteneklerinin, kendiliğinden toplanma yoluyla bir bariyer oluşturma veya bağırsak mukozasında kommensal mikroorganizmalarla birlikte topaklanma şeklinde olduğu bu sayede bağırsak mukozasına patojen bakterilerin yapışmasının engellendiği düşünülmektedir. Bu yüzden agregasyon yeteneği istenen özellikler arasında kabul edilmektedir. Probiyotik özellik gösteren laktobasil suşlarının agregasyon mekanizması tam olarak belirlenemese de bunun proteinler, glikoproteinler, taykoik asit gibi hücre yüzeyi üzerindeki bileşenler arasındaki karmaşık etkileşimlerin bir sonucu olduğu düşünülmektedir (Goh ve Klaenhammer, 2010). Agregasyonu destekleyen bazı etmenlerin ve bunları kodlayan genlerin varlığı, *L. crispatus*, *L. johnsonii*, *L. gasseri*, *L. paracasei* ve *L. coryniformis* dahil olmak üzere bazı laktobasiller için farklı çalışmalarda belirlenmiştir (Goh ve Klaenhammer, 2010). LAB koagregasyon özelliğinden dolayı bulunduğu ortama giren patojenlere agrege olarak onları etkisiz hale getirir ve olası bir enfeksiyonu,

bakterinin toksik etkisini engelleyerek önlemiş olur (Kolenbrander vd., 1990). Probiyotik bakteriler, ağız boşluğunda bulunan mikroorganizmaların kolonizasyonunda da etkili olan tutunma ve/veya koagregasyon faktörleri gibi farklı kolonizasyon mekanizmalarına sahiptirler. Laktobasillerin insanlarda ince ve kalın bağırsağa tutunma ve kolonize olma mekanizmaları, hayvanlardaki tutunma ve kolonizasyon mekanizmalarından farklıdır (Eryılmaz, 2011).

Bağırsak mukozasında, enterik patojenlerin kolonize olması sonucu, durumu kontrol altına almaya yönelik güçlü bir inflamatuvar cevap ortaya çıkar. Ancak bazen bu inflamatuvar yanıtın beklenmedik bir etki göstererek, bağırsak mikrobiyotasının yaşayabilirliğini azalttığı ve patojenin boşalmış nişleri işgal etmesine izin verdiği de görülmüştür. Memeli bağırsağı son derece karmaşık ve zengin bir ekosistemdir. Bakteriler, sayısız ekstraselüler sinyal molekülü üretme-algılama yeteneklerine sahiptirler ve bağırsak, konakçı ile patojenler arasında oluşacak çok hücreli sinyalleşme katmanları için kapsamlı bir platform oluşturmaktadır (Sekirov vd., 2010).



Şekil 2.5. Bağırsaklardaki mikrobiyota ve patojenler ile aralarındaki sinyal dağılımı (Sekirov vd., 2010)

Şekil 2.5’de 7 farklı yol verilmiştir. Bunlar bağırsaklardaki mikrobiyota ve patojenler ile aralarındaki sinyal dağılımını anlatmaktadır. Birinci yol; mikrobiyota tarafından üretilen moleküllerin patojenler üzerinde de etkili olabildiğini göstermektedir. Örneğin, bağırsak mikrobiyotası tarafından üretilen otoindüktör-3 (AI-3)

Enterohemorajik Escherichia coli (EHEC)'in virülansını aktive edebildiğini göstermektedir. İkinci yol ise tersi şekilde patojenlerin de bağırsak mikrobiyotasını etkileyip aktive edecek sinyaller üretebildiğini belirtmektedir. Üçüncü yolda komensaller tarafından üretilen sinyallerin konakçı hücrelerini etkileyebilme yeteneğinin olduğunu göstermektedir. Buna örnek olarak *B. thetaiotaomicron*, konakçı epitel yüzey fukosilasyonunu indükleyen bir sinyal üretebilmesi verilebilir. Dördüncü yolda ise konakçı tarafından üretilen norepinefrinin enterik mikrobiyal bileşimi etkileyebildiği yani konakçı tarafından üretilen moleküllerin, kommensal bakterileri de etkileyebildiği belirtilmektedir. Beşinci yol; patojenlerin, konakçı tarafından algılanabilen moleküller üretebildiğini göstermektedir. Altıncı yolda ise konakçı hücrelerin, patojenler tarafından algılanan moleküller üretebildiğini göstermektedir. Yedinci ve son yolda ise farklı türlerin birbirleriyle etkileşime girebildiğini göstermektedir. Soru işareti ile verilen kısım ise bu etkileşimlerin tamamen metabolik nitelikte olup olmadığı veya canlı sinyal moleküllerinin üretilmesi yoluyla elde edilip edilmediğinin şu an bilinmediğini göstermektedir (Sekirov vd., 2010).

2.5. Probiyotikler

2.5.1. Probiyotik mikroorganizmaların özellikleri

İnsanlar tarafından canlı bakteri alımının ilk kayıtları 2000 yılı aşkın bir süreyi göstermektedir. Bununla birlikte probiyotikler Metchnikoff (1908) tarafından bilimsel bir temel üzerine konulmuştur. Normal bağırsak mikroflorasının konakçı üzerinde zaman zaman olumsuz etkilere neden olabileceğini ve bu etkiyi tersine çeviren 'ekşi süt' tüketiminin olduğunu belirten bir hipotez öne sürmüştür (Ali, 2010; Harzallah vd., 2013).

Probiyotik kelimesi Yunanca bir terim olup “yaşam için” anlamına gelmektedir. Antibiyotik tedavisiyle vücudun mikrobiyal dengesizliğinin probiyotik açısından zengin bir diyetle sağlanabileceğini öne sürmüştür ve probiyotiklere referans olarak gösterilen ilk öneridir (Vasiljevic ve Shah, 2008; Harzallah vd., 2013).

Lilly ve Stillwell 1965 yılında “Bir mikroorganizma tarafından salgılanıp başka birinin büyümesini destekleyen bileşiklerin” tanımlanmasında probiyotikleri kullanmışlardır. Salminen ve Schaafsma ise probiyotikleri, sadece endojen mikroflora üzerindeki etkileri ile kısıtlamayıp daha da genişletmişlerdir. Salminen probiyotiği “Konakçının sağlığını ve beslenmesini olumlu yönde etkileyen canlı bir mikrobiyal kültür” olarak açıklarken Schaafsma “Oral probiyotikler ağız yoluyla belirli sayıda alındıklarında özgün temel beslenmenin ötesinde sağlık etkileri olan canlı mikroorganizmalardır.” şeklinde tanımlamıştır (Schrezenmeir ve Vrese, 2001, Çakır ve Çakmakçı, 2004; Gürsoy vd., 2005; Yaşar ve Kurdaş, 2009; Yeşilova vd., 2010).

Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak tanımlanabilmesi için zorunlu kriterler bulunmaktadır. Bunlar LABIP (Laktik Asit Bakteri Endüstriyel Platformu) tarafından belirlenmiştir. Buna göre probiyotik potansiyeli taşıyan mikroorganizmaların özellikleri şunlar olmalıdır;

- ✓ Mikroorganizmalar, gelişmiş teknikler kullanılarak tanımlanmış, güvenilir suşlar olmalıdır.
- ✓ Suşun kesin hatlarla tanısının yapılmış olması gereklidir. Patojenik bir geçmişe sahip olmamalıdır.
- ✓ Patojenlerle yarışabilmeli, rekabet sonucunda probiyotik suşların bağırsak epiteline patojenlerden önce tutunabilmesi veya agregasyon oluşturabilmesi gerekmektedir.
- ✓ Mide – bağırsak sisteminde probiyotik etkinin oluşabilmesi için kullanılan suşlar mide asitliğine ve safra tuzlarına karşı dirençli olmalıdır.
- ✓ Kullanılan suşun teknolojik özelliklerinin probiyotik ürün üretimine uygun olması gerekmektedir. Büyük ölçekte üretime uygun, istenmeyen aroma bileşikleri üretmeyen, fajlara karşı dirençli suşlar probiyotik üretiminde başarılı bir şekilde kullanılabilir. Üretim süresince canlı kalabilmelidir.
- ✓ Kullanılan suş ürün içerisinde uzun süre canlılığını koruyabilmeli, üründe istenmeyen oluşumlara neden olacak maddeler üretmemelidir. Bunun yanı sıra ürettiği bazı metabolitlerle ortamdaki patojen veya kontaminant bakterileri inhibe edebilmelidir (Fuller, 1991, Alp ve Aslım, 2009; Özdoğan, 2011, Eryılmaz, 2011).

Probiyotik mikroorganizmaların en önemli grubunu LAB oluşturmaktadır. Bunların içerisinde *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türleri en yaygın olarak kullanılanlarıdır. Ayrıca probiyotik ürünlerin hazırlanmasında bazı bakteri cinsleri ile maya ve küf türlerinden de yararlanılmaktadır (Uymaz, 2010; Varsha vd., 2014). Aşağıda Çizelge 2.1’de sık kullanılan probiyotik mikroorganizmalar verilmiştir.

Çizelge 2.1. Sık kullanılan probiyotik mikroorganizmalar (Zoral, 2013; Varsha vd., 2014).

BAKTERİLER		KÜF VE MAYALAR	
<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>P. cerevisiae</i>	<i>A. niger</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>P. acidilactici</i>	<i>A. oryzae</i>
<i>L. cellebiosus</i>	<i>B. breve</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. infantis</i>	Streptococcus	<i>S. cerevisiae</i>
<i>L. lactis</i>	<i>B. longum</i>	<i>S. cremoris</i>	<i>S. boulardii</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>S. intermedius</i>	Candida
<i>L. reuteri</i>	Propionibacterium	<i>S. lactis</i>	<i>C. torulopsis</i>
<i>L. brevis</i>	<i>P. shermanii</i>	<i>S. diacetilactis</i>	Aspergillus
<i>L. casei</i>	<i>P. freudenreichii</i>	Bacillus	<i>A. niger</i>
<i>L. curvatus</i>	Bacteriodes	<i>B. subtilis</i>	<i>A. oryzae</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. capillus</i>	<i>B. pumilus</i>	
<i>L. plantarum</i>	<i>B. suis</i>	<i>B. lentus</i>	
<i>L. johsonli</i>	<i>B. ruminicola</i>	<i>B. licheniformis</i>	
<i>L. helveticus</i>	<i>B. amylophilus</i>	<i>B. coagulans</i>	
<i>L. salivarius</i>	Leuconostoc		
<i>L. gasse</i>	<i>L. mesenteroides</i>		
<i>L. sporogenes</i>	Bifidobacterium		

Gastrointestinal kanallara geçen bakterilerin canlı kalabilmeleri için sindirim enzimlerine ve safra tuzuna dayanıklı olması gerekir. Probiyotik bakteriler, bağırsak mukozasında yaşayabilirler ve sağlıklı bir insan vücudunda florayı oluştururlar. Vücudun mukoz membranlarında ve sindirim bölgelerinde kolonize olarak, mukozal ve sistemik bağışıklığı düzenlerler. Ayrıca laktik asit, asetik asit, bakteriyosin, hidrojen peroksit gibi antimikrobiyal maddeler üreterek bağırsaklarda istenmeyen mikroorganizmaların çoğalma hızını kontrol ederler (Doğan, 2012).

Bazı probiyotikler, β -galaktosidaz enzimini sentezleyebilmeleri nedeniyle laktozu parçalayabilmektedir. Dolayısıyla laktoz vucüt tarafından parçalanamasa da probiyotikler aracılığıyla parçalanarak emilimi sağlanabilmektedir (Zhao vd., 2007).

Probiyotiklerin antikanserojen etkilerini prokanserojenlerin bozunması, kanserojen enzimlerinin (β -glukuronidaz, nitroredüktaz, azoredüktaz gibi) aktivitesini azaltması ve antimutajenik bileşenler oluşturması ile sağladığı düşünülmektedir (Saarela vd., 2000).

Antikanserojen etkilerinde bir diğer önemli faktör de asetat, bütirat ve propiyonat gibi kısa zincirli yağ asitleri oluşturmalarıdır. Kısa zincirli yağ asitleri antikanserojen bileşenler arasında gösterilmektedir. Özellikle bütiratın histon proteinlerinin fosforilasyonu ve asetilasyonu ile gen ekspresyonunu etkilemektedir. Probiyotikler prebiyotik bileşenleri parçalayarak kısa zincirli yağ asitleri oluşturmaktadır. Bu sebeple oluşan sinerjistik etki sonucu simbiyotiklerin daha etkin antikanserojen etkiye sahip olduğu belirtilmektedir. Bu görüş birçok çalışma ile desteklenmektedir (Comanne vd., 2005).

Probiyotik özellik gösteren mikroorganizmaların sahip olduğu düşünülen özelliklerinden birisi de kolesterol seviyesini düşürmeleridir (Pinto vd., 2006). Probiyotik mikroorganizmaların bu etkilerinden dolayı son zamanlarda bu alandaki çalışmalar hız kazanmıştır (Iranmanesh vd., 2014; Chang-Qing ve Rong 2015; Alp ve Ertürkmen 2017).

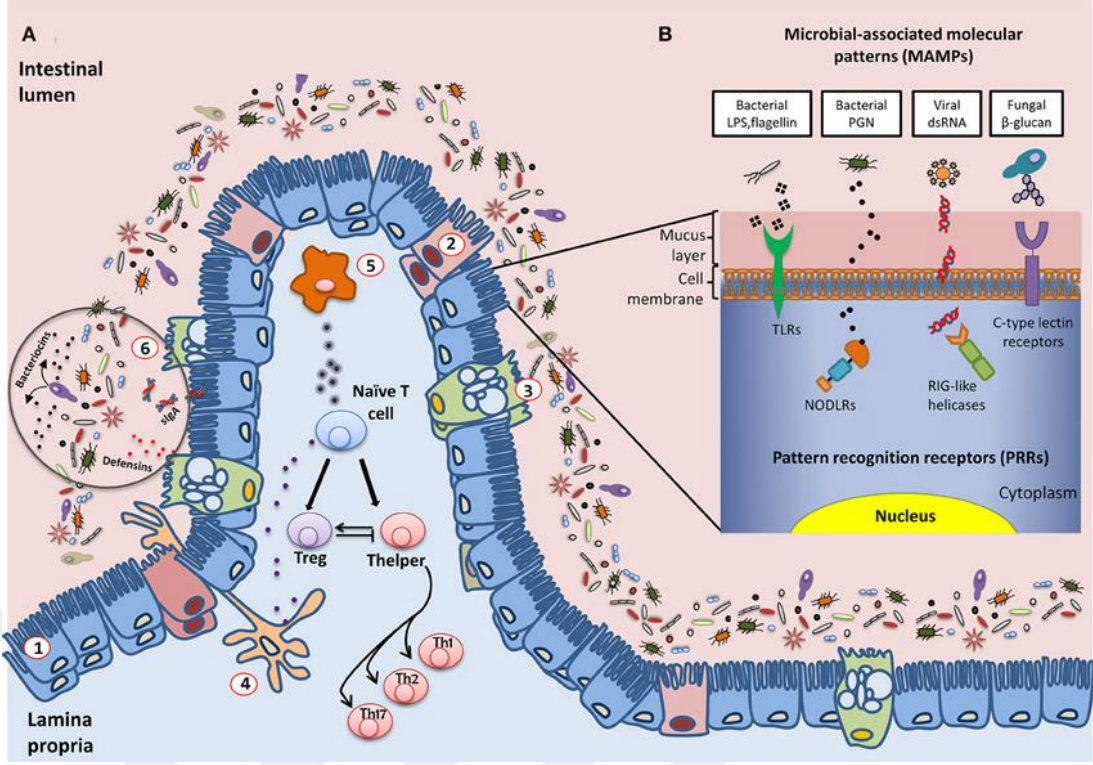
Yapılan çalışmalar sonucu *L. acidophilus*'un bazı suşlarının kolesterolü asimile edebildiği (Rasic vd., 1992), probiyotik Laktobasillerin ve Bifidobakterlerin safra tuzlarını serbest asitlere parçalayarak, konjuge safra tuzlarının intestinal sistemden daha hızlı uzaklaştırılmasını sağladıkları gözlenmiştir. Bunu serbest safra tuzlarının vücuttan atılması ile kolesterolden yeni safra asitlerinin sentezinin yapılmasını dolayısıyla vücuttaki toplam kolesterol konsantrasyonunun düşmesini sağlayarak yaptıkları düşünülmektedir (Laurens-Hattingh ve Viljoen, 2001; Alp ve Ertürkmen, 2017). Diğer bir düşünce ise probiyotik LAB'nin asit üretimi sonucu düşen pH değerlerinin, dekonjuge safra tuzları ile kolesterolün presipitasyonuna neden olduğu ve böylece kolesterolün azalmasını sağladığı şeklindedir (Çakır, 2003; Alp ve Ertürkmen, 2017).

2.5.2. Probiyotiklerin etki mekanizması

Probiyotikler, gastrointestinal sistemdeki etkinliklerini farklı mekanizmalar ile göstermektedirler. Bunlar arasında, antibakteriyel maddeler salgılamak, bağırsak duvarına yapışmalarını önlemek için patojenlerle alan yarışına ve patojenlerin hayatta kalmasını engellemek için besin rekabetine girmek, bağırsak epitelinde enfeksiyonun bazı sonuçlarını tersine çevirecek şekilde salgı değişiklikleri yapmak ayrıca bakteriyel metabolizmayı bozan ya da üretilen toksini inhibe etme özelliği olan organik asit, hidrojen peroksit ve bakteriosinler gibi maddeler salgılamak şeklindedir (Varsha, 2014; Wedajo vd., 2015).

Probiyotik mikroorganizma seçimi için ana kriterlerden biri, bağırsaklarda patojenler ile besin ve alan için yarışma yetenekleridir. Probiyotikler gastrointestinal sistemin mukozal yüzeyi üzerindeki stereospesifik (üç boyutlu/uzaysal yapıya özgül) reseptörler için patojenlerin yapışmasını geciktirerek veya engelleyerek onlarla rekabet ederler. Mikrofloranın gelişimi ve patojenlerle olan rekabetçiliği, reseptörlere yapışabilmesi, probiyotiklerin özgüllüğüne ve yaklaşık konsantrasyonlarına bağlıdır. Probiyotiklerin etkinlik gösterebileceği miktarları ise reseptör bölgelerine olan bu özgüllükleri ile belirlenebilmektedir (Salminen vd., 2005; Toma vd., 2006). Farklı probiyotikler ve hatta farklı suşların farklı etki modları bulunmaktadır (Toma vd., 2006).

Örneğin *Saccharomyces boulardii*'nin *Clostridium difficile* kaynaklı bağırsak hastalığında, *S. boulardii*'nin bağırsak mukozasındaki toksin reseptörünün bozunumunu önlediği düşünülmektedir. Diğer varsayılan mekanizmalar arasında, enterositler arasındaki sıkı bağlantı noktalarının güçlendirilmesi, IgA üretiminin artırılması ve hümmoral ve/veya hüccresel bağışıklığın uyarılmasıdır (Varsha, 2014). Şekil 2.6'da probiyotik mikroorganizmaların etki mekanizmaları şematize edilmiştir.



Şekil 2.6. Probiyotik mikroorganizmaların etki mekanizmaları (Hevia vd., 2015)

Özetle, probiotiklerin genellikle gastrointestinal sistem ve ilişkili bağışıklık sistemini etkilediği düşünülmektedir. Farklı probiyotik bakterilerin etkilerini araştırmak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır ve yapılmaya devam etmektedir (Varsha, 2014).

2.5.3. Probiyotik özellik taşıyan laktik asit bakterilerinin özellikleri

2.5.3.1. Düşük pH ve safra tuzlarına direnç

Probiyotikler, ince ve kalın bağırsaklara ulaşabilmek için asidik ortamlara dayanıklı olmalıdırlar (Corcoran vd., 2005). Bu nedenle lizozim başta olmak üzere, ağız boşluğunda bulunan enzimlere dayanıklı olması ve midenin gastrik ortamından (pH 1.5-3.0) etkilenmemelidir (Eryılmaz, 2011). *Lactobacillus* suşlarının doğasında bu özellik bulunmasına rağmen bazı türler ve suşlar arasında pH 3.0 ve altında duyarlılıkları artanlar da görülmektedir. Asit toleransı probiyotik olma özellikleri içerisinde istenilen bir özelliktir. Probiyotiklerin gastrik transit çalışmaları hem yapay mide suyu hem de hayvan ve insan gastrik suları ile çalışılmaktadır. Ancak bu çalışmaların her ikisinin de sınırları vardır; bunlardan bazıları mide sekresyonlarının ve diyetdeki bileşenlerin probiyotik sağ kalım üzerindeki etkisidir. Bunlara ek olarak

çalışmalarda kullanılan asitlendirilmiş MRS ortamı gibi tamponlama özelliği olan ortamların bu çalışmalarda kullanılması, bakterilere enerji ve metabolik öncüler sağlayarak asite karşı koruma sağlayabilir. Bundan yola çıkararak gastrointestinal yolda probiyotiklerin hayatta kalmayı arttırmaları için gıda bileşenlerinin kullanımının kapsamlı bir şekilde incelenmesi gerektiği belirtilmektedir (Corcoran vd., 2005).

Probiyotik mikroorganizmalar gastrointestinal sistemden geçebilmek için düşük pH nın yanı sıra safra tuzlarına karşı da dirençli olabilmelidirler. *In vivo* testler maddi olarak pahalı, zaman isteyen ve etik kurul denetimi gerektiren testlerdir (Dixit vd., 2013). Safra tuzlarının bakterilerin gelişimi üzerindeki etkisinde, safra tuzu konsantrasyonu ile bakteri karakteristiği arasında ilişki bulunmaktadır. Bakteriler, bağırsak yolunun taşıma sürecinde, farklı safra tuzu konsantrasyonlarında hayatta kalma kabiliyetine sahip olabilirler. Dolayısıyla, insan gastrointestinal sisteminde asit ve safra tuzu koşullarında hayatta kalabilen suşlar, potansiyel probiyotik mikroorganizmalardan biri olarak kabul edilir (Soliman vd., 2015).

2.5.3.2. Pepsin ve pankreatine karşı direnç

Sindirim enzimleri, yağların, proteinlerin ve karbondhidratların parçalanmasında ve sindirim sisteminin dahil olduğu tehlikeli hastalıkların engellenmesinde görev alır. Sindirim sistemi elemanlarından biri olan pankreas, bir endokrin ve bir ekzokrin bölümden oluşmaktadır. Endokrin bölüm, insülin, glukagon ve somatostatin salgılanmasından sorumlu olan Langerhans adacıklarından oluşur. Ekzokrin bölüm ise (akınus kesecikleri) sindirim enzimlerini üretir (Roxas, 2008). Proteazlar, protein /peptitlerin daha küçük peptidler ve amino asitler haline gelmesinden sorumlu olan mide (pepsin) ve ince bağırsakta (tripsin ve kimotripsin) ağırlıklı olarak bulunan enzimlerdir (Bublin vd., 2008; Hur vd., 2011).

Probiyotik suşlardan fizyolojik, immünolojik, metabolik, genetik ve teknolojik özelliklerin yanı sıra toksisite, patojen olmama, bağışıklık tepkilerini modüle etme kabiliyeti ve antimikrobik maddelerin üretimi gibi faydalı özelliklere sahip olmaları ayrıca hedef bölgeye yapışabilme, gastrik asit ve safraya direnebilme, gastrointestinal sistemde hayatta kalabilme ve oğalabilmenin yanı sıra *Salmonella typhimurium*,

Listeria monocytogenes, *Helicobacter pylori* ve *Staphylococcus aureus* gibi patojen bakterilere karşı antagonize olabilme gibi özellikleri de içermeleri beklenmektedir (Sung-Mee vd., 2009).

Probiyotiklerin bu özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan bir *in vitro* sindirim modelinde yer alan enzim türleri; araştırılan başlıca gıda bileşenlerini, örneğin lipid sindirimi için lipazlar, protein sindirimi için proteazlar ve nişasta sindirim için amilazları içermelidir (Hur vd., 2011). Sindirim işleminin farklı aşamalarının denemelerini doğru yapabilmek için farklı enzimlerin genellikle birlikte çalışmaktan ziyade sırayla ilave edildiği unutulmamalıdır. Birçok *in vitro* mide ve ince bağırsak benzetme modellerinde de pepsin ile ardışık olarak pankreatin verilmektedir (Boisen ve Eggum, 1991; Hurvd., 2011).

Abdel-Aal vd., (2008) yaptığı çalışmada üç enzimli (tripsin, kimotripsin ve peptidaz) bir basamaklı sindirimin, iki enzimli (pepsin ve pankreatin) iki basamaklı sindirim yöntemiyle elde edilen değerden yaklaşık % 39-66 daha yüksek sindirilebilirliği sağladığını belirlemiştir. Üç enzimli sindirim yönteminin *in vivo* koşullarla karşılaştırılabileceğini ve kompleks enzimleri (örneğin tükürük, mide suyu, duodenal su veya safra suyu karışımı) kullanan *in vitro* sindirim yöntemlerinin tek enzim kullanılan yöntemlere kıyasla daha tekrarlanabilir olma avantajına sahip olduğunu görmüştür. Proteolitik enzimlerin seçiminin, sindirim koşulları ve protein hidrolizatlarının analizi için kullanılan yöntemlerde protein sindirilebilirliği üzerinde önemli bir etkisinin olduğunu belirlemiştir.

2.5.3.3. Fenol direnci ve lizozim toleransı

Mide sıvısı, gastrik mukozada meydana gelen salgıların bir karışımıdır. Yetişkin bir insanda normal yemek ve açlık periyotlarını içeren 24 saatte 2-3 litre mide sıvısı salgılanmakta olup, mide sıvısının bileşiminde % 97-98 oranında su bulunmakta, geri kalanı ise inorganik maddeler ve organik maddelerden oluşmaktadır. Mide sıvısında bulunan başlıca inorganik maddeler; anyon olarak Cl^- , HCO_3^- , PO_4^{3-} ve SO_4^{2-} ; kation olarak ise H^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{+2} ve Mg^{+2} 'dir. Ayrıca mukus, pepsin, intrinsik faktör, gastrik lipaz, nükleazlar, rennin (kimozin), lizozim, LDH, üreaz ve karbonik anhidraz mide sıvısında bulunan organik maddeleri oluşturmaktadır (Göçer vd., 2016).

Lizozim ticari olarak kullanım alanına sahip olan tek antimikrobiyal enzim olarak bilinmektedir (Sudağdan, 2013). Serum proteinleri arasında yer alan lizozim enzimi, bakteri hücre duvarında bulunan N-asetil müramik asit ile N-asetil glikozamin arasındaki β -1,4 glikozidik bağı parçalayarak bakterilerin parçalanmasına yol açan antimikrobiyal bir enzimdir (Akman, 1967; Gür vd., 2010; Sudağdan, 2013).

Probiyotik mikroorganizmalar, bağırsak sisteminde kanserojen bileşiklerden (fenol, nitrozamin) bazılarını inaktive ederek veya inhibe ederek, bağışıklık yanıtını teşvik ederler. Prokanserojenleri kanserojene çeviren nitro-redüktaz, azoredüktaz ve beta-glukuronidaz gibi enzim aktivitelerini indirgedikleri de belirtilmektedir. Bifidobakteriler, şekerleri fermente ederek asetik, formik ve laktik asit üretmektedirler. Buna bağlı olarak, bağırsak pH'sı düşmekte, böylece bazı patojen bakterilerin gelişmesini engellemektedirler. Aynı zamanda Bifidobakteriler düşük pH ile bakteri toksinlerini, fenol ve aminlerin üretimini de kısıtlarlar (Can, 2007).

2.5.3.4. Antibiyotik direnci

Antibiyotiklerin keşfi insanlık tarihi açısından bir dönüm noktası niteliğindedir ve milyonlarca insanın hayatının kurtulmasını sağlamıştır. Üretim şekli ve orjinine göre antibiyotikler doğal, yarı sentetik ve sentetik olarak sınıflandırılır. Doğal antibiyotikler organizmaların ikincil metabolitleri olup, bu organizmaların doğada canlılığını devam ettirebilmesi için sentezlenmektedir (Ferrer vd., 2017).

Antibiyotiklerin tedavi edici özelliklerinden etkilenen bakteri suşları, büyük ölçüde gelişmiş ve kendilerine stratejiler geliştirmişlerdir. Bunlar direnç ve tolerans olarak adlandırılmaktadır (Salminen vd., 1998; Ashraf ve Smith, 2016). Bir bakterinin, antimikrobiyal bir ajanın öldürücü veya üremeyi durdurucu etkisine karşı koyabilme yeteneği direnç olarak tanımlanmaktadır. Direnç gelişimi gereksiz ve uygunsuz antibiyotik kullanımına bağlanmakla birlikte bakterilerin olumsuz çevre koşullarına adapte olabilmek için geliştirdiği bir savunma mekanizmasıdır (Yüce, 2001).

Yaygın antibiyotik kullanımı ve bakterilerin olumsuz çevre koşullarında yaşamını sürdürmek için kullandığı savunma mekanizmalarının da antibiyotik direncinin oluşmasına etki ettiği (Kankaya vd., 2017) ayrıca direnç durumunda antibiyotiğin

çok yüksek konsantrasyonlarda kullanılmadığı ve mikroorganizmanın antibiyotiğin sürekli bulunması durumunda dahi gelişim gösterebildiği düşünülmektedir (Salminen vd., 1998; Ashraf ve Smith, 2016).

Tolerans ise tedavi süresinin sınırlı olmasına rağmen yüksek antibiyotik konsantrasyonlarında, mikroorganizmanın hayatta kalabilmeyi sağladığı durumdur (Salminen vd., 1998; Ashraf ve Smith, 2016).

İnsan tedavisinde kullanılan antibiyotikler ile hayvanlarda kullanılan antibiyotikler arasında çapraz direnç bulunmaktadır. Çapraz direnç sonucunda hayvan gelişiminde kullanılan antimikrobialler, insanlarda tedavi amacıyla kullanılan ilaçlara dirence neden olmaktadır (Kankaya vd., 2017).

Probiyotik mikroorganizma seçiminde antibiyotik direncinin önemi ise bu bakterilerin direnç genlerini transfer etme kapasitelerinin olmasındandır. Probiyotikler bağırsağa girdiğinde yerli flora ile etkileşime girerler ve gen aktarımı meydana gelir. Bu yolla gastrointestinal sistemde bulunan kommensal veya patojen bakterilere antibiyotik direnç genlerinin aktarılmasına katkıda bulunabilirler (Quinto vd., 2014).

Probiyotik suşlarda antibiyotik direncinin belirlenmesi fenotipik ve genotipik yöntemlerle yapılabilmektedir bunlar;

- I. Her bakteri suşu için en uygun antibiyotiklerin minimum inhibisyon konsantrasyonu (MiK) ile belirlenmesi (Quinto vd., 2014; Florez vd., 2007).
- II. PCR tabanlı teknikler ve mikroarray analizi kullanımı (Ammor vd., 2008; Korhonen vd., 2010; Quinto vd., 2014).

2.5.3.5. Ekzopolisakkarit üretimi ve kolesterol asimilasyonu

Ekzopolisakkaritler, (EPS) düz veya dallanmış monosakkaritlerin glikozidik bağ ile bağlanması sonucu oluşan, yüksek molekül ağırlığına sahip polimerlerdir (Yalçın, 2016). Homopolisakkarit ve heteropolisakkarit olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır. Homopolisakkaritler, üç veya daha fazla monosakkaritten oluşurken, heteropolisakkaritler farklı monosakkaritlerin birleşmesiyle oluşmaktadır (Minervini vd., 2010). Heteropolisakkaritler çoğunlukla hücre içerisinde

sentezlenirler ve bakteriyel EPS grubunun önemli bir kısmını oluşturmaktadırlar (Donot vd., 2012). Mikrobiyal EPS'ler hücrel lokasyonları, fiziksel ve kimyasal yapı özellikleri ve fonksiyonları baz alınarak üç ana sınıfa ayrılmaktadır. Hücre duvarının bileşeni olan lipopolisakkaritler, hücre içi karbon ve enerji kaynağı görevi gören sitozolik polisakkaritler ve slim veya kapsül formunda dış ortama salgılanan ekzopolisakkaritler olarak ayrılmaktadır (Yalçın, 2016). EPS'ler, bakteri suşlarının çoğalma evresinde suşa ve çoğalma evresinin farklı kademelerine bağlı olarak değişen koşullarda sentezlenmektedir. Sentez olayı hücre dışında veya hücre membranında gerçekleşebilmektedir (Ergene ve Avcı, 2016). EPS'lerin biyosentezi, birçok bakteri suşu için önemli bir özellik olmaktadır. Sentez için farklı enzimlerin varlığına gereksinim olmakta ve EPS biyosentezinde rol oynayan enzimlerden bazıları lipopolisakkaritlerin sentezinde de yer almaktadır (Yalçın, 2016).

EPS üreten LAB, gıda ürünleri ve fermente süt ürünlerinde özellikle tekstür özelliğini geliştirme özelliklerinden dolayı kullanılmaktadır (Boels vd., 2001). Yapılan birçok çalışma sonucunda EPS kolesterolü düşürmeye yardımcı olduğu, bağırsak florasını düzenlediği ve anti-ülser aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir (Yalçın, 2016). EPS üreten mikroorganizmalar arasında *L. bulgaricus*, *L. brevis*, *L. helveticus*, *Bacillus* spp., *L. mesenteroides*, *L. lactis* ve *Streptococcus* spp. türleri olduğu bilinmektedir ve bu mikroorganizmaların EPS üretilip/üretmediği tespiti yapılırken katı besiyerinde kolonilerin mukoid görünüşü ve sıvı besiyerinde oldukça viskoz bir ortam oluşturmalarından yararlanılmaktadır (Singha, 2012).

Kan dolaşımındaki yüksek kolesterol miktarı insanlarda kalp-damar sistemi hastalıkları için risk faktörü oluşturmaktadır. Kalp-damar sistemi hastalıkları, kanda aşırı kolesterol bulunması ile yakın ilişkili olan ve gelişmiş ülkelerdeki ölüm sebepleri içerisinde en yüksek orana sahip olanlardan birisidir (Ahire vd., 2012; Xie vd., 2011; Ahn vd., 2003; Castorena-Alba vd., 2017). Yüksek seviyede toplam kolesterol ve özellikle kabul edilir sınırların üzerinde olan düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterol, hiperkolesterolemiye neden olmaktadır (Burhan vd., 2017). Vücudumuzda kolesterol sentez hızı ile kolesterol atılım hızı farklı olabilmektedir. Bu nedenle dengenin sağlanabilmesi için bazı düzenleyici mekanizmalar mevcuttur. Kolesterol vücudumuzdan iki şekilde atılmaktadır. İlk yol feçesle atılan safra asitlerine dönüştürülmesi şeklinde olup, ikinci yol ise safra içine

salgılanarak atılabilmesi için bağırsaklara ulaştırılması şeklindedir (Champe ve Harvey, 1997). Bu iki yoldan ikincisi olan yani safra içerisine salgılanması şeklinde gerçekleşen yol kolesterolün, vücuttan atılması için izlenen en önemli yoldur. Serbest kolesterol, sulu çözeltilerde neredeyse hiç çözünmez fakat safrada, safra asitleri ve lesitin gibi lipitler vasıtasıyla çözünebilir hale gelir (Tok, 2007). Safra asitleri çok basamaklı bir metabolik yol izleyerek karaciğer tarafından sentezlenirler. Oluşan bileşikler “primer” safra asitleri olarak adlandırılan kolik asit ve kenodeoksikolik asittir. *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides* ve *Lactobacillus* gibi bağırsak bakterileri glisin ve taurin aminoasitlerini safra tuzlarından, safra tuzu hidrolaz (BSH) enzimini kullanarak ayırabilmektedirler. Bu olaya “dekonjugasyon” adı verilir (Champe ve Harvey, 1997).

Safra asitlerinin deterjan etkisi, konjuge safra tuzlarına kıyasla daha azdır. Bu nedenle dekonjuge olmuş (serbest) safra asitleri kolesterolün emiliminde, konjuge safra tuzları kadar etkili değildirler. Bu sebepten dolayı safra tuzu dekonjugasyonunun, kolesterolün çözünürlüğünü azalttığı, dolayısıyla bağırsaklardan emilimini ve ayrıca enterohepatik döngüyle karaciğere dönen safra asidi miktarını azalttığı bundan dolayı da karaciğerdeki safra asidi üretimini arttırdığı düşünülmektedir (Hofmann vd., 1983; Gilliland vd., 1985; Champe ve Harvey 1997; Ahn vd., 2003; Tok, 2007; Tok ve Aslım 2010; Anila vd., 2016). LAB'nin probiyotik olma özellikleri arasında düşük asit ve safra tuzlarına karşı direnç göstermeleri bulunmaktadır. Ayrıca bazı probiyotik suşların kandaki yüksek kolesterol seviyesini düşürebilme yeteneklerinden dolayı son yıllarda bu amaçla kullanımları gündeme gelmiştir (Pinto vd., 2006; Tok, 2007; Moal ve Servin, 2014; Iranmanesh vd., 2014; Chang-Qing ve Rong 2015; Arief vd., 2015; Syah vd., 2017; Burhan vd., 2017).

Çalışmalar, plazma kolesterolü ve düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterolü (LDL) düşürmek için bazı kültürleri içeren süt ürünlerinin tüketiminin faydalı olabileceğini göstermiştir. İnsan, fare, domuz ve sıçanlarda yapılan çalışmalar sonucu LAB'nin serum kolesterolünü azaltmada önemli bir etki gösterebileceği görülmüştür. Özellikle *Lactobacillus* cinsine ait bazı türlerin potansiyel hipokolesterolemik aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle probiyotik içeren süt ürünlerinin tüketimi, serum kolesterolü düşürmek için tavsiye edilmektedir (Wang vd., 2014). Probiyotiklerin hangi mekanizma ile serum kolesterol düzeylerini düşürdüğü henüz

tam olarak aydınlatılamamıştır. Düşünülen olası mekanizmalar arasında kolesterolün bakteri hücresi tarafından asimilasyonu, bakteriyel asit hidrolazlar ile safra asitlerinin dekonjugasyonu, kolesterolün bakteri duvarına bağlanması, hepatik kolesterol sentezinin inhibisyonu veya kolesterolün plazmadan karaciğere doğru yön değiştirmesi vardır (Noh vd., 1997; Kopp-Hoolihan vd., 2001; Kaur vd., 2002; Gill ve Guarner, 2004; Coşkun, 2006; Belviso vd., 2009).

2.5.3.6. Antimikrobiyal etki

Probiyotik mikroorganizmaların genel olarak, bağırsakta bulunan zararlı ve yararlı bakteriler arasındaki dengenin kurulmasında ve *C. difficile*, *C. jejuni*, *H. pylori* ve *Rotavirus* gibi gastro enterik patojenler üzerinde antagonistik etki gibi spesifik etkilere kadar geniş bir yelpazede etkilere sahip oldukları bilinmektedir. Bu sayede sağlıklı bir sindirim sisteminin oluşmasına katkıda buldukları düşünülmektedir (Bilkova vd., 2011).

LAB'nin diğer mikroorganizmalara karşı gösterdiği antogonistik aktivite; ürettikleri laktik ve asetik asit gibi organik asitler, H₂O₂, diasetil, alkol ve CO₂'nin yanı sıra bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri metabolitlerden kaynaklanmaktadır. Tüm bu bileşenler ayrı ayrı inhibitör etki göstermelerine karşın LAB'nin diğer mikroorganizmalara karşı antogonistik etkisi bunların yalnızca birisine bağlı olmayıp, kombinasyon sonucuda ortaya çıkabilmektedir (Çon vd., 2001; Bilkova vd., 2011; Nigam vd., 2012).

LAB içerisinde *Lactobacillus* cinsine ait türlerin çeşitli bakteriyel enfeksiyonlara karşı etkili olduğu görülmüştür. Bu yararlı etkilerini ise laktik asit, hidrojen peroksit ve benzeri antibakteriyel maddelerin salgılanması ile sağladıkları bunun sonucu olarak da patojenlerin büyümesini engelleme yeteneği gösterdikleri düşünülmektedir (Jamalifar vd., 2011).

Yapılan bazı çalışmalarda *Lactobacillus* cinsine ait suşlarda gıdadan izole edilenlere kıyasla insan izolatlarının patojenik mikroorganizmalara karşı daha iyi bir antagonistik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Dasari vd., 2014). Ayrıca yapılan çalışmalar sonucu özellikle *L. plantarum* suşunun vitaminlerin sentezi veya konak immünomodülatör partiküllerin üretimi gibi metabolik süreçler sağlama yeteneğine sahip olduğu görülmüştür (Oldak vd., 2017).

2.5.3.7. Sindirim sistemi modelleri

Probiyotik mikroorganizmaların *in vitro* ortamda canlılık düzeyini saptamak üzere birçok statik model tasarlanmış olmakla birlikte, söz konusu modeller gastrointestinal sistemdeki ardışık ve farklı özelliklerdeki koşulları simüle edememekte; daha güvenilir sonuçların elde edilebilmesi için insan gastrointestinal sisteminin farklı kısımlarını bir arada simüle edebilen dinamik *in vitro* gastrointestinal modeller geliştirilmektedir (Sumeri vd., 2008; Göçer ve Küçükçetin 2016).

Gıdaların sindirimini simüle edebilmek için sadece sindirim sisteminin biyokimyasını göz önünde bulundurmak yeterli olmamakta, sindirim sırasındaki diğer işlemlerin de eşit düzeyde dikkate alınması gerekmektedir. Dolayısıyla çeşitli sindirim işlemlerini göz ardı eden statik sindirim modellerinden, biyokimyasal, fiziksel ve mekaniksel işlemleri bir arada ele alan dinamik modellere doğru yönelme olmaktadır (Wickham vd., 2009; Göçer ve Küçükçetin, 2016). Sindirim modellerinin işleyişleri, bazı özellikler bakımından farklılık göstermektedir bunlar arasında; modelin içerdiği basamak sayısı ve çeşidi (örneğin; ağız, mide, ince bağırsak, kalın bağırsak), basamaklarda kullanılan sindirim sıvılarının bileşimi (örneğin; enzimler, tuzlar, tamponlar, biyolojik polimerler ve yüzey aktif bileşenler) ve basamaklardaki mekanik uygulamalar ile sıvı akış tipi ve hızı (örneğin; uygulanan mekanik hareketin büyüklüğü ve yönü, akış geometrisi ve akış profili) bulunmaktadır (Wickham vd., 2009; Göçer ve Küçükçetin, 2016).

Sindirim modellerinde en çok sindirim enzimleri (pankreatin, pepsin, tripsin, kimotripsin, peptidaz, amilaz, lipaz), safra tuzu ve müsin kullanılmaktadır. Farklı tip ve konsantrasyonda enzim kullanılmasına rağmen, sindirim modellerinin tümünde işlem sıcaklığı 37°C'ye ayarlanmaktadır. Sindirim süresi olarak mide, ince bağırsak ve kalın bağırsak bölümlerinin her biri için çoğunlukla ikişer saat kullanılmaktadır (Hur vd., 2011; Göçer ve Küçükçetin 2016).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Tez çalışması kapsamında Afyonkarahisar, Antalya, Erzincan, Isparta ve İzmir illerinden (44 adet peynir (yerel pazarlardan) 20 adet fermente sucuk (yerel işletmelerden), 9 adet ev yapımı çeşitli turşu, 2 adet liyofilize kırmızı biber, 3 adet tarhana ve 16 farklı taze meyve ve bitki) örnekler toplanarak izolasyon materyali olarak kullanılmıştır. Araştırmada 2015 yılı Eylül ayı ile 2016 yılı Nisan ayını kapsayan sekiz aylık süre boyunca toplam 94 adet örnek taranarak muhtemel *Lactobacillus* izolasyonu yapılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Muhtemel Laktobasil suşlarının izolasyonu ve cins düzeyinde tanısı

Muhtemel laktobasil suşlarının izolasyonu için alınan örneklerden aseptik koşullarda 10'ar gram tartılarak 90 ml steril % 0.85 'lik fizyolojik tuzlu su (FTS) çözeltisinde homojenize edilmiştir. FTS kullanılarak 10^{-6} seyreltiye kadar dilüsyon serisi hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonların ekimleri De Man Rogosa Sharpe Agara (MRS) yapılmıştır (Coeuret ve ark., 2003). Örnek dilüsyonları, drigalski spatülü ile homojen bir şekilde yayılarak petri kutuları 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Seçilen izolatların mikroskopik morfolojileri Gram boyama yöntemiyle hazırlanan preparatların ışık mikroskopunda (Zeiss, Almanya) incelenmesi ile tespit edilmiştir (Schillinger ve Lücke, 1989). Katalaz testi için MRSA ortamında geliştirilen bakteri kolonileri lam üzerine aktarılarak, üzerine % 3'lük hidrojen peroksit (Merck, Darmstadt, Almanya) çözeltisinden damlatılmış ve gaz çıkışı olup olmadığı mikroskop altında incelenmiştir. Gaz çıkışı gözlenen lamlarda test pozitif, gözlenmeyen lamlarda ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Denemelerde *S. aureus* ATCC 25923 pozitif, *E. faecalis* ATCC 29212 ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Elde edilen saf kültürler uygun besiyerlerinde geliştirildikten sonra % 20 (v/v) gliserol ortamında -18°C'de muhafaza edilmiştir (Çakır, 2003).

3.2.2. *Lactobacillus* suşlarının pH 9.6'da gelişiminin belirlenmesi

Lactobacillus suşlarının pH 9.6'da gelişiminin belirlenmesi amacıyla MRS sıvı besiyeri otoklav sonrası pH'sı 9.6 olacak şekilde ayarlanmıştır. 30°C'de 18 saat geliştirilen izolatlar, %1 oranında inoküle edilerek 37°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda pH 9.6'da gelişim göstermeyen mikroorganizmaların *Lactobacillus* cinsine ait olabilecekleri düşünülmüştür (Morandi vd., 2006).

3.2.3. % 6.5 NaCl dirençliliklerinin belirlenmesi

Lactobacillus suşlarının % 6.5 NaCl'de gelişiminin belirlenmesi amacıyla MRS sıvı besiyeri içerisinde % 6.5 NaCl olacak şekilde hazırlanmıştır. 30°C'de 18 saat geliştirilen izolatlar, % 1 oranında inoküle edilerek 37°C'de 18 saat inkübe edilmiştir (Morandi vd., 2006).

3.2.4. Glikozdan gaz oluşturma özelliklerinin belirlenmesi

Glikozdan gaz oluşturma özelliklerinin belirlenmesi amacıyla MRS sıvı besiyerine 30°C'de 18 saat geliştirilen izolatlar % 1 oranında inoküle edilmiş, 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda Durham tüplerinde oluşan gaz kabarcıkları incelenmiş ve gaz oluşturma özelliklerinin varlığı belirlenmiştir (Başyigit, 2004; Facklam vd., 1989).

3.2.5. Safra tuzuna karşı gelişimlerinin belirlenmesi

Denemelerde MRS sıvı besiyerinde 30°C'de 18 saat geliştirilen bakteri kültürleri kullanılmıştır. Gelişimin ardından kültürler safra tuzuna karşı direnç özelliğinin belirlenmesi amacıyla % 1 oranında safra tuzu içeren Fosfat Tamponu Çözeltisi (PBS) içerisine % 1 oranında ilave edilmiştir. İnkübasyonun başlangıç, 4. ve 24. saatlerinde örneklerden alınan numunelerin sayımları seri dilüsyon sonrası damla kültür yöntemi ile MRSA besiyerlerine 3 paralel olacak şekilde yapılmıştır. 37°C'de 48 saat yapılan inkübasyonun ardından kontrol ve deneme gruplarındaki koloniler sayılmıştır (Eryılmaz, 2011; Horáčková vd., 2011; Sahadeva vd., 2011; Jamaly vd., 2011; Xiao vd., 2014; Soliman vd., 2015). Safra tuzuna karşı gelişimlerinin %

canlılık oranlarının belirlenmesi için kullanılan hesaplama aşağıdaki (1) formül kullanılarak yapılmıştır (Tokatlı vd., 2015).

$$\text{Canlılık oranı \%} = \frac{\text{canlı kalan hücrelerin (kob/ml) sayısı}}{\text{Başlangıçta inoküle edilen hücrelerin (kob/ml) sayısı}} \times (100) \quad (1)$$

3.2.6. Düşük pH' ya karşı gelişimlerinin belirlenmesi

Kültürlerin düşük pH koşullarına dayanımlarının belirlenmesi amacıyla kullanılan pH derecesi ve inkübasyon süresi besinler insan sindirim sisteminden geçerken midede kalma süresi baz alınarak belirlenmiştir. Besinlerin genel olarak midede kalma süresi 3 saat olup bu süre içerisinde midenin pH'sı 1 ile 4 arasında değişmektedir (Vinderola vd., 2000). Bu amaçla kültürler, 30°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra PBS tamponun pH'sı 3.0 ve 2.0 olacak şekilde ayarlanmıştır. pH'sı ayarlanan PBS tampona aktif kültürlerden % 1 oranında aşılansak, 37°C'de 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun başlangıç, 1. ve 3. saatlerinde örneklerden alınan numunelerin sayımları seri dilüsyon sonrası damla kültür yöntemi ile MRSA besiyerlerine 3 paralel olacak şekilde yapılmıştır. 37°C'de 48 saat yapılan inkübasyonun ardından kontrol ve deneme gruplarındaki koloniler sayılmıştır (Eryılmaz, 2011; Horáčková vd., 2011; Sahadeva vd., 2011; Jamaly vd., 2011; Soliman vd., 2015).

3.2.7. Pepsine karşı gelişimin belirlenmesi

Suşların pepsine karşı direnç özelliklerinin belirlenmesi ve gastrik koşulları *in vitro* ortamda oluşturulabilmesi amacıyla kültürler 30°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra PBS tamponun pH'sı 3.0 ve 2.0 olacak şekilde ayarlanarak 3 mg/mL pepsin ilave edilmiştir. pH'sı ayarlanan PBS tampona aktif kültürlerden % 1 oranında aşılansak, 37°C'de 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun başlangıç, 1. ve 3. saatlerinde örneklerden alınan numunelerin sayımları seri dilüsyon sonrası damla kültür yöntemi ile MRSA besiyerlerine 3 paralel olacak şekilde yapılmıştır. 37°C'de 48 saat yapılan inkübasyonun ardından kontrol ve deneme gruplarındaki koloniler sayılmıştır (Maragkoudakis vd., 2006; Collado ve San 2006; Kawther vd., 2010; Eryılmaz 2011; Tokatlı vd., 2015).

3.2.8. Pankreatine karşı gelişimin belirlenmesi

Suşların pankreatine karşı direnç özelliklerinin amacıyla yapılan denemede kültürler 30°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra PBS tamponun pH'sı 8.0 olacak şekilde ayarlanarak 1 mg/mL pankreatin ilave edilmiştir. pH'sı ayarlanan PBS tampona aktif kültürlerden %1 oranında aşılansak, 37°C'de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun başlangıç ve 4. saatlerinde örneklerden alınan numunelerin sayımları seri dilüsyon sonrası damla kültür yöntemi ile MRSA besiyerlerine 3 paralel olacak şekilde yapılmıştır. 37°C'de 48 saat yapılan inkübasyonun ardından kontrol ve deneme gruplarındaki koloniler sayılmıştır (Maragkoudakis vd., 2006).

3.2.9. Lizozim toleransının belirlenmesi

Mikroorganizmaların lizozim enzimine olan tolerans durumlarını belirlemek amacıyla lizozim olmaksızın ve 100 mg/L lizozim olacak şekilde 10 ml MRS sıvı besiyerine 30°C'de 18 saat inkübe edilmiş aktif kültürlerden %1 oranında aşılansak ve 37°C'de 90 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon başlangıç ve 90. dakikasında örneklerden alınan numunelerin sayımları seri dilüsyon sonrası sonrası damla kültür yöntemi ile MRSA besiyerlerine 3 paralel olacak şekilde yapılmıştır. 37°C'de 48 saat yapılan inkübasyonun ardından kontrol ve deneme gruplarındaki koloniler sayılmıştır (Turchi vd., 2013).

3.2.10. Fenol direncinin belirlenmesi

Fenol direncini belirlemek amacıyla % 0.3 fenol eklenmiş/eklenmemiş MRS sıvı besiyeri kullanılmıştır. 30°C'de 18 saat inkübe edilmiş aktif kültürlerden % 1 oranında, aşılama yapılmıştır. İnkübasyonun başlangıç ve 24. saatlerinde örneklerden alınan numunelerin sayımları seri dilüsyon sonrası sonrası damla kültür yöntemi ile MRSA besiyerlerine 3 paralel olacak şekilde yapılmıştır. 37°C'de 48 saat yapılan inkübasyonun ardından kontrol ve deneme gruplarındaki koloniler sayılmıştır (Kılıç vd., 2013).

3.2.11. Antibiyotik dirençliliğin belirlenmesi

İzolatların antibiyotik direnci disk difüzyon yöntemi kullanılarak fenotipik olarak değerlendirilmiştir. MRS sıvı besiyeri içerisinde 30°C’de 18 saat inkübasyon ile elde edilen aktif kültürlerden 2’şer mL alınmış ve 4000 devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Peletler 1 mL fosfat tampon (PBS) ile yıkanmış ve bu işlem 2 kez tekrar edilmiştir. Elde edilen peletler 1 mL PBS’de çözülmüştür. Hazırlanan süspansiyonların yoğunluğu PBS ile 0.5 McFarland bulanıklık standardına ayarlanmıştır. Standardize edilmiş hücre süspansiyonlarından 350 µL alınarak MRS katı besiyerine dökme kültür yöntemi ile ekim yapılmış besiyerleri katılaştıktan sonra üzerlerine Oxoid Ltd. (İngiltere) firmasından temin edilen ampisilin (10 µg), eritromisin (15 µg), gentamisin (10 µg), kloramfenikol (30 µg), metisilin (5 µg), kanamisin (30 µg), streptomisin (30 µg), klindamisin (2 µg), neomisin (30 µg), penisilin G (10 U), amoxycillin-clavulanic acid (30 µg), siprofloksasin (5 µg), teikoplanin (30 µg), tetrasiklin (30 µg), nalidisik asit (30 mg), basitrasin (10 U) ve vankomisin (30 µg) içeren antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. Petri kutuları 37 °C’de 18 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda antibiyotik diskleri etrafında oluşan zon çapları kumpas yardımı ile ölçülmüştür (Cariolata vd., 2008). İzolatların antibiyotik duyarlılık düzeyleri National Committee for Clinical Laboratory Standarts (NCCLS, 2016) kılavuzuna göre duyarlı, orta seviyede dirençli ve dirençli olarak değerlendirilmiştir.

3.2.12. 16S Mikrobiyal tanımlama analizi

Tez çalışması kapsamında izolatların 16S rDNA dizi analizi ile tanımlanması GEN Plaza Biyoteknoloji Merkezi tarafından hizmet alımı şeklinde yapılmıştır.

3.2.13. Ekzopolisakkarit üretimlerinin belirlenmesi

İzolatların farklı karbonhidrat kaynaklarını kullanarak ekzopolisakkarit üretimlerinin belirlenmesi amacıyla MRS besiyeri modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla hem standart MRS besiyeri, hem de bileşiminde yer alan glukoz yerine fruktoz, laktoz ve sükroz % 2 olacak şekilde hazırlanarak kullanılmıştır. Çalışma öncesinde ekzopolisakkarit (EPS) üreticisi olabilecek suşların belirlenmesi için kültürler önce

farklı şekerler içeren MRSA besiyerinde 30°C’de 3 gün inkübe edilmişlerdir. İnkübasyonun sonunda mukoz yapıda koloni oluşturan izolatlar muhtemel ekzopolisakkarit üreticisi olarak seçilmişlerdir. Seçilen koloniler aynı şeker bileşiminde hazırlanmış MRS sıvı besiyerine alınarak tekrar 30°C’de 3 gün inkübe edilmişlerdir. İnkübasyonun sonunda örnekler 10 dakika 100°C’de kaynatılmış, ardından 900 µL % 85’lik Triklor asetik asit (TCA) ve 900 µL örnek olacak şekilde darası alınmış 2 mL’lik santrifüj tüplerine alınarak 10.000 rpm’de 25 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası üstte kalan süpernatanttan 500 µL alınmış üzerine 1500 µL soğuk etanol eklenerek 1 gece -18°C’de bekletilmiştir. Daha sonra tekrar 10.000 rpm’de 25 dakika santrifüjlenmişlerdir. Santrifüj sonrası süpernatant dökülmüş etanolün uzaklaştırılması için 60°C’de 1 gece bekletilmiştir. Kurutulan tüpler sürenin sonunda tekrar tartılmış ve sonuçlar mg/L olacak şekilde hesaplanmıştır (Smitinont vd., 1999; Feng vd., 2012).

3.2.14. Kolesterol asimilasyon yeteneklerinin belirlenmesi

İzolatların kolesterol asimilasyon özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Anandharaj ve Sivasankari (2014) çalışmalarında kullandığı yöntem modifiye edilmiştir. MRS sıvı besiyeri % 0.3 safra tuzu ve % 2 kolesterol içerecek şekilde hazırlanmıştır. Aktif kültürlerden % 1 oranında aşılama yapıldıktan sonra 37°C’de 18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda 4000 rpm’de 20 dakika santrifüj edilmiş toplanan süpernatant Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesinde Backman Coulter AU5800 model analizör ile toplam kolesterol miktarı belirlenmiştir.

3.2.15. Otoagregasyon özelliklerinin belirlenmesi

Kültürler 30°C’de 18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 4000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilerek iki kez PBS ile yıkanmış, spektrofotometrede 600 nm absorbansda optik yoğunluğu 0.60 ± 0.02 olacak şekilde PBS’de ayarlanmıştır. Bu şekilde 4 mL hazırlanan kültür 10 saniye vortekslenerek otoagregasyon özelliği 5 saat süresince oda sıcaklığında hareket ettirmeden bekletilmiştir. İnkübasyonun başlangıç, 2. ve 5. saatlerinde üst kısımdan 0.1 mL alınarak 3.9 mL PBS ile seyreltilerek kültürün bekletme öncesi ve bekletme sonrası optik yoğunlukları 600

nm’de okunmuştur. % otoagregasyon hesaplama (2)’nolu formül kullanılarak hesaplanmıştır (Aslım vd., 2007; Collado vd., 2008; Eryılmaz, 2011).

$$\text{Otoagregasyon \%} = [1 - (A_t/A_0) \times 100] \quad (2)$$

(A: Absorbans, t: saat, 0: 0.saat)

3.2.16. Koagregasyon özelliklerinin belirlenmesi

Koagregasyon özelliğinin belirlenmesi amacıyla kültürler 30°C’de 18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 4000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilerek iki kez PBS ile yıkanmış, spektrofotometrede 600 nm absorbansda optik yoğunluğu 0.60 ± 0.02 olacak şekilde PBS’de ayarlanmıştır. Koagregasyon için Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilen *S. enteritidis* ve *E. coli* kullanılmıştır. Her iki patojen mikroorganizmadan 1 mL alınarak LAB süspansiyonu ile eşit miktarda karıştırılarak, 10 saniye vortekslenerek koagregasyon özelliği 5 saat süresince oda sıcaklığında hareket ettirmeden bekletilmiştir. Her saat başında üst fazdan 0.1 mL alınarak 3.9 mL PBS ile seyreltilerek kültürün bekletme öncesi ve bekletme sonrası optik yoğunlukları 600 nm’ye ayarlanmış spektrofotometrede okunmuştur. Koagregasyon yüzdesinin belirlenebilmesi için (3)’nolu formül kullanılmıştır;

$$\text{Koagregasyon \%} = [(A_{\text{pat}} + A_{\text{pro}})/2 - (A_{\text{karışım}})/(A_{\text{pat}} + A_{\text{pro}})/2] \times 100 \quad (3)$$

Formülde $A_{\text{karışım}}$ koagregasyon yüzdesi belirlenmek istenen saatin sonuçları, diğerleri ise başlangıç sonuçları olmalıdır (Collado vd., 2008; Eryılmaz, 2011).

3.2.17. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

3.2.17.1. Suşların test bakterileri üzerine genel inhibisyon etkileri

Laktik asit bakterilerinin diğer mikroorganizmalara karşı gösterdiği antagonistik aktivite, ürettikleri laktik ve asetik asit gibi organik asitler, H₂O₂, bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri metabolitler, diasetil, alkol ve CO₂ gibi metabolitlerden kaynaklanmaktadır (Çon ve Gökalp, 2001). Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

amacıyla agar spot (Spot on lawn) ve kuyu difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Kültürler 30°C'de 18 saat MRSA besiyerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda koloniler iğne öze yardımı ile alınarak MRSA besiyerine nokta ekim yapılmış, 18 saat 37°C'de inkübe edilmişlerdir. İndikatör bakteri olarak Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilen *S. enteritidis*, *E. coli*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* kullanılmıştır. Test mikroorganizmaları 37°C'de 18 saat inkübasyonun ardından 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek iki kez PBS ile yıkanmış ve MacFarland 0.5 olacak şekilde ayarlanarak 15 mL Tyryptic Soy yumuşak agar (Merck) besiyerine % 1 olacak şekilde aşılansmış ve MRSA besiyerinin üzerine dökülmüştür. 24 saat inkübasyonun sonunda oluşan zon çapları ölçülmüştür (Toure vd., 2003; Sumathi ve Reetha 2012).

Kuyu difüzyon yöntemi için kültürler LAB'leri 30°C'de 18 saat MRS sıvı besiyerinde inkübe edilmiştir. İndikatör bakteri olarak yine *S. enteritidis*, *E. coli*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* kullanılmıştır. Patojen mikroorganizmalar 18 saat 37°C'de Tyryptic Soy sıvı besiyerine inkübe edilmişlerdir. Laktik asit bakterileri 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant alınmıştır. Alınan süpernatantların pH'ları 6.5 olacak şekilde 1M NaOH ile ayarlanmış ve 0.45 µ filtreden geçirilmiştir. Yoğunlukları 0.5 MacFarland olacak şekilde ayarlanmış indikatör mikrrorganizmalar, Tyryptic Soy sıvı besiyerine % 1 oranında aşılansmış ve petrilere dökülmüştür. Katılaştan besiyerine 6 mm kuyucuk açılarak buraya 60 µL süpernatant inoküle edilmiş, 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda oluşan zon çapları ölçülmüştür (Çadırcı ve Çitak 2010; Sumathi ve Reetha 2012; Gaamouche vd., 2014; Adeniyi vd., 2015; Bolanle vd., 2015; Gulbe vd., 2015; Balouri vd., 2016).

3.2.18. Sindirim sistemi modellemesi

İnsan sindirimi; mideye giren gıdaların besine dönüşerek vücut tarafından büyüme, hücrelerin yenilenmesi ve enerji gereksinimi için kullanılmasını sağlayan ve sağlık için gerekli karmaşık bir süreçtir. İnsan sindirimi esnasında iki ana işlem bulunmaktadır bunlardan ilki; gıdaların boyutunu küçülten mekanik dönüşüm ikincisi ise makromoleküllerin daha küçük bileşenlere hidrolize olarak kan dolaşımına absorbe edildiği enzimatik dönüşüm aynı anda gerçekleşmektedir (Göçer

ve Küçükçetin 2016; Guerra vd., 2012). Bu amaçla yaptığımız sindirim sistemi modellemesinde kültürler 30°C’de 18 saat inkübe edilmiş ardından PBS tamponun pH’sı 3.0 olacak şekilde ayarlanarak 3 mg/mLpepsin ilave edilmiştir. pH’sı ayarlanan PBS tampona aktif kültürlerden %1 oranında aşılansarak, 37°C’de 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun başlangıç ve 3. saatlerinde örneklerden alınan numunelerin sayımları seri dilüsyon sonrası damla kültür yöntemi ile MRSA besiyerlerine 3 paralel olacak şekilde yapılmıştır. 37°C’de 48 saat yapılan inkübasyonun ardından kontrol ve deneme gruplarındaki koloniler sayılmıştır (Maragkoudakis vd., 2006). 3 saatlik inkübasyonun ardından kültürler 3500 rpm’de santrifüj edilmiş ve pelet alınmıştır. Alınan peletler, pH’sı 8.0 olacak şekilde ayarlan PBS tampona 1 mg/mLpankreatin ve % 1 Ox-Bile ilave edilmiştir. pH’sı ayarlanan PBS tampona aktif kültürlerden % 1 oranında aşılansarak, 37°C’de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun başlangıç ve 4. saatlerinde örneklerden alınan numunelerin sayımları seri dilüsyon sonrası damla kültür yöntemi ile MRSA besiyerlerine 3 paralel olacak şekilde yapılmıştır. 37°C’de 48 saat yapılan inkübasyonun ardından kontrol ve deneme gruplarındaki koloniler sayılmıştır (Maragkoudakis vd 2006; Collado ve San 2006; Kawther vd., 2010; Eryılmaz 2011; Tokatlı vd., 2015).

3.2.19. Suşların bağırsak hücrelerine tutunma özelliğinin taramalı elektron mikroskopunda (SEM) görüntülenmesi

Bağırsak hücrelerine tutunma deneyinin SEM’de incelenmesi amacıyla bağırsak hücrelerinden alınan örnekler Süleyman Demirel Üniversitesi YETEM (Enerji Teknolojileri Araştırma Birimi)’de bulunan QUANTA FEG 250 Taramalı Elektron Mikroskobu kullanılarak yapılmıştır.

3.2.20. Bağırsak epitellerinin (brush border) hazırlanması ve İzolatların bağırsak hücrelerine tutunma ve patojenlerin tutunmalarını engelleme yeteneklerinin belirlenmesi

3.2.20.1. Bağırsak epitellerinin (brush border) hazırlanması

Bağırsak hücrelerine tutunma ve patojenlerin tutunmalarını engelleme yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla yeni kesilmiş hayvanın (koyun) bağırsakları alınmıştır. Alınan

bağırsakların içi boşaltıldıktan sonra ön yıkama amacıyla 0.15M NaCl ile yıkanmışlardır. Ardından bağırsaklar iç-dış olacak şekilde çevrilerek 0.096M NaCl, 0.008M KH₂PO₄, 0.0056M Na₂HPO₄, 0.0015M KCl ve 0.01M Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) içeren (pH 6.8) çözelti ile esas yıkama işlemi yapılmıştır. Bu çözelti içerisinde 15- 20 dakika oda sıcaklığında bekletilen bağırsaklar 0.096M NaCl, 0.008M KH₂PO₄, 0.0056M Na₂HPO₄, 0.0015M KCl ve 0.3M sükröz içeren çözelti içerisine alınarak steril şişelerde -18°C’de 1 gece muhafaza edilmiştir (Kerkhof vd., 2006; Sellwod vd., 1975). Şekil 3.1’de Yıkama öncesi ve sonrası bağırsaklar verilmiştir.



Şekil 3.1. Yıkama öncesi ve sonrası bağırsaklar

3.2.20.2. İzolatların bağırsak hücrelerine tutunma ve patojenlerin tutunmalarını engelleme yeteneklerinin belirlenmesi

İzolatların bağırsak epitel hücrelerine tutunma ve patojenlerin tutunmalarını engelleme yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla denememizde *Lactobacillus casei* DA4, *Weissella cibaria* DA28, *Lactobacillus plantarum* DA100, *Lactobacillus plantarum* DA140 ve *Lactobacillus coryniformis* DA263 suşları ile Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilen *Escherichia coli* Tip I, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* serotype Enteritidis, *Listeria monocytogenes* ile *Clostridium difficile* (Sağlık Bakanlığı, Refik Saydam Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonu Birimi) kullanılmıştır.

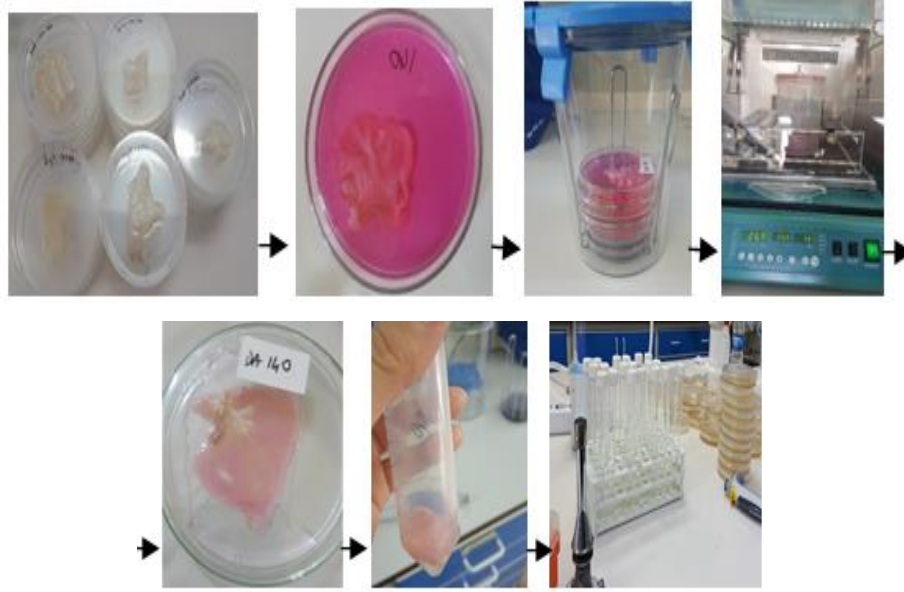
Ön temizleme işlemi yapılmış bağırsak parçaları tekrar kısa süreli olarak yıkamada kullanılan temizleme çözeltilerinden geçirilmiştir. Ardından bağırsak hücreleri steril

santrifüj tüplerine alınarak 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin ardından bağırsak parçalarından steril bistüri yardımı ile 2 cm eninde halka şekilli parçalar kesilmiştir. Ardından halka şeklindeki bağırsakların bir yanı kesilerek düz yüzey haline getirilmiş ve 2x2 cm boyutlarında olacak şekilde tekrar kesilmişlerdir. En-boy (alan) ölçümünün kontrol edilmesinin ardından iç epitelleri üst kısma gelecek şekilde petri kutularına konulmuştur. Şekil 3.2'de kesilerek petri kutularına alınan bağırsak parçaları verilmiştir.



Şekil 3.2. Kesilerek petri kutularına alınan bağırsak parçaları

Laktik asit bakterilerinin bağırsak hücrelerine tutunma yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla düz yüzey haline getirilmiş, iç epitelleri üst kısma gelecek şekilde petri kutularına konulan bağırsak hücrelerinin üzerine 5 mL'lik 1.2×10^9 kob/ml laktik asit bakterisi içeren PBS süspansiyonu ve 3 katı hacimde Dulbecco medium eklenerek tutunmanın sağlanması amacıyla 60 dakika 37°C 'de 40 rpm'de hafif çalkalama ile inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda bağırsak dokusu steril pens ile alınarak PBS ile 3 kez yıkama yapılmıştır. Yıkama sonrası bağırsak parçaları darası alınmış steril santrifüj tüplerine alınarak ağırlık tartımı yapılmış, ardından 1/10 (v/v) olacak şekilde FTS eklenerek homojenize edilmiştir. Seri dilüsyonların ardından MRS besiyerine ekim yapılmış, 48 saat 37°C 'de inkübasyonun sonunda sayım yapılmıştır (Kerkhof vd., 2006; Sellwod vd., 1975; Ouwehand ve Salminen 2003; Lehto ve Salminen 1997; Eden vd., 1977). Şekil 3.3'de Bağırsaklara uygulanan işlem basamakları sırası ile verilmiştir.



Şekil 3.3. Bağırsaklara uygulanan işlem basamakları sırası

Laktik asit bakterilerinin patojen mikroorganizmaların bağırsak hücrelerine tutunmalarını engelleme yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla düz yüzey haline getirilmiş, iç epitelleri üst kısma gelecek şekilde petri kutularına konulan bağırsak hücrelerinin üzerine 5 mL'lik 1.2×10^9 kob/ml laktik asit bakterisi içeren PBS süspansiyonu ile yine 5 mL'lik 1.5×10^6 kob/ml patojen mikroorganizma içeren PBS süspansiyonu ve 3 katı hacimde Dulbecco medium eklenerek tutunmanın sağlanması amacıyla 60 dakika 37°C 'de 40 rpm'de hafif çalkalama ile inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda bağırsak dokusu steril pens ile alınarak PBS ile 3 kez yıkama yapılmıştır. Yıkama sonrası bağırsak parçaları darası alınmış steril santrifüj tüplerine alınarak ağırlık tartımı yapılmış, ardından 1/10 (v/v) olacak şekilde FTS eklenerek homojenize edilmiştir. Seri dilüsyonların ardından laktik asit bakterileri için MRS besiyerine ekim yapılmış, 48 saat 37°C 'de inkübasyonun sonunda sayım yapılmıştır. Patojen mikroorganizmalar için seri dilüsyonların ardından;

- ✓ *Escherichia coli* Tip I için Violet Red Bile Agar (Merck),
- ✓ *Escherichia coli* O157:H7 için Sorbitol MacConkey Agar (LABM)
- ✓ *Salmonella enterica* serotype Enteritidis için Bismuth Sulfite Agar (Merck),
- ✓ *Listeria monocytogenes* PALCAM Agar (Merck) ve PALCAM Listeria Selective Supplement (LAB X144)
- ✓ *Clostridium difficile* Tryptose Sulfite Cycloserine Agar (Biolife) (Tryptose Sulfite Cycloserine Agar supplement, Sigma-Aldrich) ve yumurta sarısı

besiyerlerine yayma ekim yapılmış, 18 saat 37°C'de inkübasyonun sonunda sayım yapılmıştır (Sellwod vd., 1975; Eden vd., 1977; Lehto ve Salminen 1997; Ouwehand ve Salminen 2003; Kerkhof vd., 2006).



4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Muhtemel *Lactobacillus* Suşlarının İzolasyonu ve Cins Düzeyinde Tanısı

İzolasyon için toplam 94 farklı örnek kullanılmıŐtır. Bunlardan 270 adet koloni sečilmiŐtir. Çalışma materyali olarak sečilten bu koloniler öze yardımı ile MRS sıvı besiyerine alınmıŐ, 30°C’de 18 saat geliŐtirilmiŐ ve inkübasyon süresini takiben MRS agarda saflık kontrolleri yapılmıŐtır. Saf oldukları tespit edilen kùltürler % 20 (v/v) steril gliserol iğereren MRS sıvı besiyeri ortamında -18°C’de muhafaza edilmiŐtir. Çalışma kapsamında incelenen 44 adet peynirden 77 adet izolat, 20 adet fermente sucukdan 17 izolat, 9 adet çeŐitli turŐulardan 21 izolat, 2 adet liyofilize kırmızı biberden 5 izolat ve 16 farklı taze meyve ve bitkiden 17 izolat elde edilirken 3 adet tarhanadan izolat elde edilememiŐtir.

Sečilten izolatların mikroskobik morfolojileri Gram boyama yöntemi ile hazırlanan preparatların ışık mikroskobunda incelenmesi ile tespit edilmiŐtir. Gram boyama sonrası 137 tanesinin *Lactobacillus* cinsine ait olabileceği düşün÷lmüŐtür. İzolatlara uygulanan katalaz testinin tüm izolatlarda negatif sonuç verdiği tespit edilmiŐtir. İzolatlar, pH’sı 9.6’ya ayarlanmıŐ ve % 6.5 NaCl iğereren iki farklı MRS sıvı besiyerine inoküle edilerek geliŐme özellikleri ve glikozdan gaz üretme özellikleri incelenmiŐtir. Uygulanan kùltürel testler sonucunda 69 adet izolatin *Lactobacillus* cinsine ait özelliklere sahip olduğu düşün÷lmüŐtür. Uygulanan kùltürel testler sonucunda elde edilen bulgular Çizelge 4.1’de verilmiŐtir.

Çizelge 4.1. Uygulanan kültürel testler sonucunda elde edilen bulgular

İzolat No		pH 9.6'da gelişme	% 6.5 NaCl'de gelişme	Katalaz	Glikozdan gaz oluşturma
DA 1	Tulum Peyniri (Antalya/Akseki)	—	+	—	+
DA 2	Tulum Peyniri (Antalya/Korkuteli)	—	+	—	+
DA 3	Tulum Peyniri (Erzincan)	—	+	—	+
DA 4	Tulum Peyniri (Erzincan)	—	+	—	+
DA 5	Ezine Peyniri (Isparta)	—	+	—	—
DA 6	Ezine Peyniri (Isparta)	—	+	—	+
DA 7	Ezine Peyniri (Isparta)	—	+	—	+
DA 8	Bergama Tulum Peyniri (Isparta)	—	+	—	+
DA 9	Tulum Peyniri (Erzincan)	—	+	—	+
DA 10	Bergama Tulum Peyniri (Isparta)	—	+	—	+
DA 16	Beyaz Peynir (İzmir/Bozdağ)	—	+	—	+
DA 20	Köy Peyniri (İzmir/Ödemiş)	—	+	—	—
DA 22	Tulum Peyniri (İzmir/Ödemiş)	—	+	—	—
DA 23	Tulum Peyniri (İzmir/Ödemiş)	—	+	—	+
DA 25	Tulum Peyniri (İzmir/Ödemiş)	—	+	—	—
DA 27	Tulum Peyniri (İzmir/Ödemiş)	—	+	—	+
DA 28	Tulum Peyniri (İzmir/Ödemiş)	—	+	—	+
DA 29	Tulum Peyniri (İzmir/Ödemiş)	—	+	—	+
DA 30	Tulum Peyniri (İzmir/Ödemiş)	—	+	—	+
DA 49	Tulum Peyniri	—	+	—	+
DA 50	Beyaz Peynir (İzmir/Ödemiş)	—	+	—	+
DA 52	Tulum Peyniri (İzmir)	—	—	—	+
DA 97	Turşu (Isparta)	—	+	—	+
DA 100	Turşu (Isparta)	—	—	—	+
DA 116	Turşu (Isparta)	—	—	—	+
DA 133	Beyaz Peynir (Antalya)	—	+	—	+
DA 134	Beyaz Peynir (Antalya)	—	+	—	—
DA 135	Ezine Peyniri (Antalya)	—	+	—	—
DA 136	Ezine Peyniri (Antalya)	—	+	—	—
DA 140	Tulum Peyniri (Antalya/Korkuteli)	—	+	—	—
DA 141	Tulum Peyniri (Antalya/Korkuteli)	—	+	—	+
DA 142	Tulum Peyniri (Antalya/Korkuteli)	—	+	—	+
DA 144	Tulum Peyniri (Antalya/Korkuteli)	—	+	—	+
DA 146	Tulum Peyniri (Antalya/Korkuteli)	—	+	—	+
DA 151	Kırmızı Biber (Isparta)	—	+	—	+
DA 152	Kırmızı Biber (Isparta)	—	+	—	+
DA 154	Kırmızı Biber (Isparta)	—	+	—	+

Çizelge 4.1. Uygulanan kültürel testler sonucunda elde edilen bulgular (Devam)

İzolat No		pH 9.6'da gelişme	% 6.5 NaCl'de gelişme	Katalaz	Glikozdan gaz oluşturma
DA 155	Kırmızı Biber (Isparta)	—	+	—	+
DA 161	Beyaz Peynir (Antalya)	—	+	—	+
DA 168	Van Otlı Peyniri (Antalya)	—	+	—	+
DA 194	Beyaz Peynir (Adana/Ceyhan)	—	+	—	+
DA 199	Femente Sucuk (Afyon)	—	+	—	—
DA 201	Femente Sucuk (Afyon)	—	+	—	+
DA 203	Femente Sucuk (Afyon)	—	—	—	—
DA 204	Femente Sucuk (Afyon)	—	+	—	—
DA 217	Femente Sucuk (Afyon)	—	+	—	+
DA 218	Femente Sucuk (Afyon)	—	+	—	+
DA 225	Femente Sucuk (Isparta)	—	+	—	+
DA 231	Taze Beyaz Peynir (Antalya)	—	—	—	—
DA 240	Taze Beyaz Peynir (Antalya)	—	+	—	+
DA 241	Taze Beyaz Peynir (Antalya)	—	+	—	+
DA 242	Taze Beyaz Peynir (Antalya)	—	+	—	+
DA 245	Zeytin	—	+	—	+
DA 247	Zeytin	—	+	—	+
DA 249	İncir	—	—	—	+
DA 254	Hammeli	—	+	—	+
DA 255	Mor Dut	—	+	—	+
DA 256	Biberiye	—	+	—	+
DA 257	Erik	—	—	—	+
DA 258	Erik	—	—	—	+
DA 259	Mor Dut	—	+	—	+
DA 260	Mor Dut	—	+	—	+
DA 261	Beyaz Dut	—	+	—	+
DA 262	Turunç	—	+	—	+
DA 263	Turunç	—	+	—	+
DA 266	Ceviz	—	+	—	+
DA 267	Ceviz	—	—	—	+
DA 268	Yeni Dünya	—	—	—	+
DA 270	Taze Beyaz Peynir	—	—	—	—

4.2. Safra Tuzuna Karşı Gelişimlerinin Belirlenmesi

Çalışmamızda 69 adet *Lactobasillus* spp. suşunun % 1 safra tuzuna karşı 0., 4. ve 24. saat sonundaki gelişimleri belirlenmiştir. İzolatların ağırlıklı olarak safra tuzuna karşı 24 saat sonunda canlı kalmayı başarmış ve % 68.80 ile % 105.35 arasında canlılık oranları belirlenmiştir. 14 adet izolat (DA6, DA10, DA16, DA27, DA30, DA50, DA52, DA136, DA155, DA203, DA247, DA258, DA259, DA262) deneme sonunda, DA97, DA141, DA152, DA154, DA 231, DA240, DA249 ve DA261 kodlu

mikroorganizmalar ise -18°C’de muhafaza sırasında canlılıklarını kaybetmişlerdir. Çizelge 4.2’de Safra tuzuna karşı 0., 4. ve 24. saat sonundaki gelişimleri belirlenen mikroorganizmaların log-kob/ml sonuçları ile canlılık yüzdeleri verilmiştir.

Olejnik vd., (2005) *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşlarının düşük pH, safra tuzu ve sindirim enzimlerine karşı olan dirençliliklerini belirlemişlerdir. % 3 safra tuzunda 1., 2. ve 3. saatteki canlılık oranları tespit edilmiştir. Buna göre *L. casei* 3. saatin sonunda % 77.4, *L. helveticus* % 63.3 ve *L. acidophilus* ise % 53.8 canlılık göstermiştir. Eryılmaz (2011) vajinal sekresyondan izole ettiği laktik asit bakterilerinin % 0.3, % 0.5 ve % 1 oranında safra tuzuna karşı 0., ve 4. saatlerdeki dirençliliğini tespit etmiştir. *L. brevis* OZV suşunda 4. saatte % 0.3’lük konsantrasyonlarda canlılık oranı % 95.98 olarak tespit edilmiş % 0.5 ve % 1’lik konsantrasyonlarda da yine bu rakamlara ulaşılmıştır. Jamally vd., (2011) çalışmasında Fas’a özgü süt ürünlerinden izole ettiği *L. plantarum*, *L. paracasei* ve *L. brevis* suşlarının % 0.2, % 0.3, % 0.5 ve % 1 oranında safra tuzuna karşı 0., ve 24. saatlerdeki dirençliliklerini tespit etmiştir. İzolatlar % 0.2 ve % 0.3 safra tuzuna karşı gelişim gösterirken % 1 safra tuzuna karşı canlılık değerleri düşük çıkmıştır. En yüksek canlılık oranı % 1 de % 65.20 olarak belirlenmiştir. Horáčková vd., (2011) çalışmasında *Lactobacillus* suşlarının % 0.3 ve % 1.0 oranında safra tuzuna karşı 2., 4., 7., 24. ve 48. saatlerdeki canlılık oranları incelenmiş % 0.3’e karşı tüm suşlar % 95 üzerinde canlılık gösterirken % 1 oranında safra tuzuna karşı direnç mikroorganizmalarda 24., ve 48. saatlerde artış göstererek ortalama % 90 canlılık oranı vermişlerdir. Wang vd., (2014) fermente hardaldan izole ettikleri 50 adet laktik asit bakterisinin % 0.5 ve % 1 safra tuzuna dirençlilik özelliklerini incelemişlerdir. Mikroorganizmalardan sadece *Lactobacillus* suşları safra tuzuna dirençlilik gösterebilmiştir. Anandharaj vd., (2015) yaptıkları çalışmada *Lactobacillus* ve *Weissella* suşlarının % 0.3 ve % 0.5 oranında safra tuzuna karşı dirençliliğini tespit etmişlerdir. % 0.3 ‘lük safra tuzunda *Lactobacillus* suşları ortalama % 81 *Weissella* suşları ise % 84 oranında canlılık göstermişlerdir. % 0.5’lik safra tuzunda ise bu oranlar % 30’lara kadar inmiştir. Uraipan ve Hongpattarakere (2015) çalışmalarında laktik asit bakterileri ve bifidobakterlerin gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalara karşı antogonistik etkilerini incelemişlerdir. Bu amaçla % 0.3 safra tuzuna karşı 24-72 saat sonunda mikroorganizmaların canlılığını belirlemişlerdir. Deneme sonunda, suşlardan en iyi canlılığı *B. longum* NIF7AN2 ve *L. plantarum* CIF17AN8 sırasıyla

% 95.80 ve % 80.03 olarak vermiştir. Sharma vd., (2016) geleneksel süt ürünlerinden elde ettiği laktik asit bakterilerinin % 0.3, 0.7, 1.0, 1.5 ve % 2 safra tuzuna karşı 24. saat sonundaki dirençliliklerini tespit etmiştir. Çalışılan laktik asit bakterileri içerisinde en yüksek sonuçları *L.casei* suşları yaklaşık % 90-95 aralığında canlılık oranı göstererek vermiştir.

Çalışmada toplam 69 adet izolata safra tuzu dirençlilik testi yapılmıştır. Çalışmalarda genellikle bu testin MRS besiyeri ile yapıldığı görülmüştür. Ancak MRS besiyerinin tamponlama özelliği ve mikroorganizmaların vücudumuzda gelişimlerini destekleyici herhangi bir ortam olmadan safra tuzları ile karşılaştıkları göz önüne alınarak çalışmamızda PBS ile çalışılmıştır. Önceki yıllarda yapılan çalışmalarda genellikle % 0.3 ve % 0.5 oranında safra tuzu ile çalışıldığı görülmüştür. Çalışmamızda ise % 1 oranında safra tuzu ile deneme yapılmıştır. Bu deneme sonucunda 0-4 ve 0-24. saatlerdeki sonuçlar diğer çalışmalar ile kıyaslandığı zaman düşük oranlar olmasına rağmen bu durum göz önüne alındığında iyi bir canlılık oranı elde edilmiştir.

Çizelge 4.2. Safra tuzuna karşı 0., 4., 24. saat sonundaki gelişime durumları ve canlılık oranları

Bakteri Kod Numarası	0.h.	4.h.	24.h.	0-4% Canlılık	0-24 %Canlılık
<i>DA 1</i>	7.44	7.43	7.18	99.86	96.50
DA 2	7.48	8.15	7.63	108.95	102.00
DA 3	8.14	7.69	6.88	94.47	84.52
DA 4	7.50	7.33	7.22	97.73	96.26
DA 5	8.01	7.95	8.03	99.25	100.24
DA 6	7.31	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 7	8.62	8.29	8.03	96.17	93.15
DA 8	7.98	7.61	7.88	95.36	98.74
DA 9	7.00	7.13	7.02	101.85	100.28
DA 10	7.80	7.12	0.00	91.28	0.00
DA 16	7.80	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 20	7.83	7.67	7.64	97.95	97.57
DA 22	7.75	7.64	6.49	98.58	83.74
DA 23	8.43	7.84	7.56	93.00	89.67
DA 25	7.74	7.70	7.54	99.48	97.41
DA 27	7.80	7.26	0.00	93.07	0.00
DA 28	7.34	7.34	7.26	100.00	98.91
DA 29	6.75	6.95	7.00	102.96	103.70
DA 30	7.55	7.64	0.00	101.19	0.00
DA 49	7.80	7.99	7.47	102.43	95.76
DA 50	6.97	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 52	7.93	7.25	0.00	91.42	0.00
DA 100	7.05	6.93	6.81	98.29	96.59
DA 116	7.46	7.46	7.47	100	100.13
DA 133	7.36	6.97	6.43	94.70	87.36
DA 134	8.49	8.40	8.40	98.93	98.93
DA 135	7.79	7.33	8.12	94.09	104.23
DA 136	7.32	7.32	7.32	89.67	89.67
DA 140	7.18	7.18	7.12	100.00	99.16

Çizelge 4.2. Safra tuzuna karşı 0., 4., 24. saat sonundaki gelişime durumları ve canlılık oranları (Devam)

Bakteri Kod Numarası	0.h.	4.h.	24.h.	0-4 %Canlılık	0-24 %Canlılık
DA 142	7.69	8.06	7.90	104.81	102.73
DA 144	8.27	7.71	5.69	93.22	68.80
DA 146	7.69	7.49	7.95	97.39	103.38
DA 151	7.67	7.98	6.60	104.04	86.04
DA 155	6.69	7.35	0.00	109.86	0.00
DA 161	8.05	7.81	7.88	97.01	97.88
DA 168	7.93	7.55	7.71	95.20	97.22
DA 194	7.98	7.65	7.61	95.86	95.36
DA 199	8.25	7.82	7.88	94.78	95.51
DA 201	7.10	7.24	7.48	101.97	105.35
DA 203	6.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 204	6.49	6.73	7.04	103.69	108.47
DA 217	7.41	7.91	7.63	106.74	102.96
DA 218	7.69	7.81	7.51	101.56	97.65
DA 225	7.85	7.70	7.90	98.08	100.63
DA 241	8.05	8.17	7.56	101.49	93.91
DA 242	7.54	7.78	7.34	103.18	97.34
DA 245	8.11	7.89	7.61	97.28	93.83
DA 247	7.81	7.47	0.00	95.64	0.00
DA 254	7.93	7.14	6.95	90.03	87.64
DA 255	7.90	7.61	7.62	96.32	96.45
DA 256	7.41	7.52	7.52	101.48	101.48
DA 257	7.82	7.49	7.23	95.78	92.45
DA 258	7.47	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 259	7.77	7.4	0.00	95.23	0.00
DA 260	7.88	7.53	7.63	95.55	96.82
DA 262	7.07	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 263	7.36	7.18	7.22	97.55	98.09
DA 266	7.90	7.95	7.18	100.63	90.88
DA 267	7.65	6.87	7.05	89.80	92.15
DA 268	8.17	7.52	7.25	92.04	88.73
DA 270	7.34	7.21	6.88	98.22	93.73

4.3. Düşük pH'da Gelişime

Mide pH'sı 1-4 arasında değişmektedir ve besinler midede en az 90 dakika kalmaktadır. Bu nedenle mikroorganizmaların probiyotik özellik gösterip göstermediklerini, bu pH ve süreye dayanıp dayanamadıklarını belirleyebilmek amacıyla *in vitro* tolerans testleri uygulanmaktadır (Castorena-Alba vd., 2017). Safra tuzuna karşı canlılığını devam ettiren 47 adet laktik asit bakterisinin pH 3.0 ve pH 2.0'de inkübasyonun başlangıç, 1. ve 3. saatlerdeki canlılık oranları belirlenmiştir. Çizelge 4.3'te mikroorganizmaların pH 2'ye Çizelge 4.4'te ise pH 3'e karşı 0., 1. ve 3. saat sonundaki canlılık sonuçları kob/ml ve yüzde canlılık olarak verilmiştir. Çalışmamızda pH 2.0'de 7 adet izolat 1. saat sonunda canlılığını korurken DA49, DA256 ve DA263 kodlu izolatlar 3. saatin sonunda da bu pH'da canlılıklarını korumuşlardır. pH 3.0'de ise 47 adet izolattan 11 adet izolat 1. saatin sonunda canlılıklarını kaybetmişlerdir.

Corcoran vd., (2005) çalışmalarında asidik ortamlarda metabolize edebilecekleri şeker varlığında/yokluğunda probiyotik laktobasillerin gelişimlerini incelemişlerdir. Metabolize edebileceği şeker bulunmayan örnekler pH 2.0'de gelişim gösterememişlerdir. Sahadeva vd., (2011) beş farklı geleneksel süt ürününden izole ettikleri laktik asit bakterilerinin farklı özelliklerini tespit etmişlerdir. Bu amaçla yaptıkları düşük pH'ya karşı dayanıklılık testinde mikroorganizmalar, pH'sı 1.5 ve 3.0 'a ayarlanmış PBS 'de 3 saat inkübe edilmiş ve 0., 1.5 ve 3. saatlerde MRSA'ya ekim yapılarak 48 saat sonundaki canlılıkları tespit edilmiştir. Çalışmada pH 1.5'a karşı gelişim gösterebilen mikroorganizma olmamıştır. Horáčková vd., (2011) çalışmalarında farklı *Lactobacillus* şuşlarının gastrointestinal sistemdeki canlılıklarını belirlemişlerdir. pH 2.0'de 0., 2., ve 3. saatlerde canlılık tespiti yapmışlardır. Mikroorganizmalarda 3. saatin sonunda ortalama 1-2 logaritma düzeyinde düşüş gözlemlemişlerdir. Eryılmaz (2011) vajinal sekresyondan izole ettiği laktik asit bakterilerinin pH 1.0, pH 2.0 ve pH 3.0'deki canlılıklarını tespit etmiştir. *P. acidilactici* OZV suşu pH 1.0' de. 1 saat içerisinde canlılığını kaybederken pH 2.0'de 1. saatin sonunda % 66.74 canlılık oranı tespit etmiştir. 3. saatin sonunda ise canlılığını kaybettiği görülmüştür. pH 3.0' de 3. saatin sonunda % 70.62 oranında canlılık göstermiştir. *L. brevis* OZV suşu ise 1. ve 3. saatte herhangi bir canlılık gösterememiştir. pH 2'de 1. saatin sonunda % 64.94 canlılık oranı

gözlemlenirken 3. saatte hiçbir canlılık oranı gözlemlenmiştir. pH 3'de 3. saatin sonunda canlılık oranı % 71.80 olarak saptanmıştır. Dixit vd., (2013) üç farklı *L. acidophilus* suşunun probiyotik olma özelliklerini incelemiştir. Bu amaçla yaptıkları düşük asite direnç testinde MRS besiyerinin pH'sını 2.5'e ayarlamış ve 2. ve 4. saatlerdeki canlılıklarını belirlemiştir. Suşlar yüksek bir canlılık oranı göstermiştir. Soliman vd., (2015) *L. acidophilus*, *L. casei* ve *L. plantarum* suşlarının probiyotik olma özelliklerini incelemiştir. Bu amaçla pH 2.0 ve pH 3.0'de canlılıklarını belirlemiştir. *L. acidophilus* pH 2.0'de canlılık gösterebilirken diğer iki mikroorganizma bu asit değerinde canlı kalamamışlardır. Rajoka vd., (2018) çalışmasında kümes hayvanlarının bağırsaklarından izole edip tanımladıkları 13 adet laktobasil suşunun probiyotik olma özelliklerini incelemiştir. Bu amaçla yaptıkları düşük pH'ya dayanım testinde suşların pH 2.0 ve pH 3.0'deki canlılık oranlarını belirlemiştir. Suşların tamamı pH 2.0'de % 82'nin üstünde, pH 3.0'te ise % 91'in üzerinde canlılık göstermiştir.

Elde edilen sonuçlar yapılan çalışmalar ile paralellik göstermiştir. İzolatlar pH 3.0'te canlılıklarını genel olarak korumuşlardır. Sonuç değerlendirmelerinde bir sonraki analize tabi tutulmayacak izolatlar pH 3.0'te 3. saatin sonunda canlılığını kaybedenler olarak belirlenmiştir. Geriye kalan 33 mikroorganizma ile pepsin analizine geçilmiştir.

Çizelge 4.3. Mikroorganizmaların pH 2’de 0., 1. ve 3. saat sonundaki sayıları ve canlılık oranları (%)

Bakteri Kod Numarası	0h.	1h.	3 h.	0-1h. Canlılık %	1-3h. Canlılık %	0-3h. Canlılık %
DA 1	6.77	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 2	7.74	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 3	7.55	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 4	7.26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 5	7.83	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 7	7.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 8	7.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 9	7.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 20	6.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 22	7.45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 23	8.13	4.69	0.00	57.68	0.00	0.00
DA 25	8.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 28	8.10	4.09	0.00	50.49	0.00	0.00
DA 29	8.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 49	8.17	5.36	4.69	65.60	87.50	57.40
DA 100	8.21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 116	7.92	5.69	0.00	71.84	0.00	0.00
DA 133	7.45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 134	8.19	4.39	0.00	53.60	0.00	0.00
DA 135	8.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 136	7.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 140.0	7.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 142	7.57	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 146	7.57	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 151	7.55	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 161	7.43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Çizelge 4. 3. Mikroorganizmaların pH 2’de 0., 1. ve 3. saat sonundaki sayıları ve canlılık oranları (%) (Devam)

Bakteri Kod Numarası	0h.	1h.	3 h.	0-1h. Canlılık %	1-3h. Canlılık %	0-3h. Canlılık %
DA 168	7.59	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 194	7.48	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 199	6.97	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 201	7.59	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 204	6.97	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 217	8.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 218	8.69	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 225	8.71	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 241	8.51	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 242	8.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 245	8.56	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 254	8.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 255	8.60	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 256	8.77	6.00	7.00	68.41	116.66	79.81
DA 257	8.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 260	8.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 263	8.77	6.00	7.00	68.41	116.66	79.81
DA 266	8.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 267	8.61	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 268	8.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 270	8.51	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Çizelge 4.4. Mikroorganizmaların pH 3’de 0., 1. ve 3. saat sonundaki sayıları ve canlılık oranları (%)

Bakteri Kod Numarası	0h.	1h.	3h.	0-1h. Canlılık %	1-3h. Canlılık %	0-3h. Canlılık %
DA 1	7.50	8.00	0.00	106.66	0.00	0.00
DA 2	7.56	6.92	7.74	91.53	111.84	102.38
DA 3	7.73	7.62	7.78	98.57	102.09	100.64
DA 4	7.20	6.91	7.13	95.97	103.18	99.02
DA 5	7.95	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 7	7.59	5.47	7.23	72.06	132.17	95.26
DA 8	7.03	7.57	7.50	107.68	99.07	106.68
DA 9	7.71	7.62	7.75	98.83	101.70	100.51
DA 20	6.30	6.30	6.30	100.00	100.00	100.00
DA 22	7.58	6.94	6.67	91.55	96.10	87.99
DA 23	7.93	7.74	7.75	97.60	100.12	97.73
DA 25	8.09	4.88	0.00	60.32	0.00	0.00
DA 28	8.28	7.91	8.35	95.53	105.56	100.84
DA 29	8.26	7.94	6.85	96.12	86.27	82.92
DA 49	8.41	7.07	0.00	84.06	0.00	0.00
DA 100	8.42	7.49	0.00	88.95	0.00	0.00
DA 116	8.17	6.05	0.00	74.05	0.00	0.00
DA 133	7.58	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 134	8.50	5.73	4.55	67.41	79.40	53.52
DA 135	8.13	7.68	0.00	94.46	0.00	0.00
DA 136	8.14	5.93	0.00	72.85	0.00	0.00
DA 140	8.02	5.06	0.00	63.92	0.00	0.00
DA 142	8.55	5.38	0.00	62.92	0.00	0.00

Çizelge 4.4. Mikroorganizmaların pH 3’de 0., 1. ve 3. saat sonundaki sayıları ve canlılık oranları (%) (Devam)

Bakteri Kod Numarası	0h.	1h.	3h.	0-1h. Canlılık %	1-3h. Canlılık %	0-3h. Canlılık %
DA 146	7.98	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 151	7.94	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 161	7.98	7.78	5.52	97.49	70.95	69.17
DA 168	8.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 194	8.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 199	8.32	8.18	8.04	98.31	98.28	96.63
DA 201	7.59	6.98	0.00	91.96	0.00	0.00
DA 204	7.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 217	8.30	8.12	8.13	97.83	100.12	97.95
DA 218	8.32	7.90	6.74	94.95	85.31	81.00
DA 225	8.69	7.84	6.54	90.21	83.41	75.25
DA 241	8.57	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 242	8.15	5.73	4.41	70.30	76.96	54.11
DA 245	8.59	7.96	0.00	92.66	0.00	0.00
DA 254	8.53	5.65	0.00	66.23	0.00	0.00
DA 255	7.63	5.50	0.00	72.08	0.00	0.00
DA 256	8.19	7.04	0.00	85.95	0.00	0.00
DA 257	8.76	0.00	0.00	78.76	0.00	0.00
DA 260	8.66	6.90	0.00	45.03	0.00	0.00
DA 263	7.83	7.60	0.00	97.06	0.00	0.00
DA 266	8.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 267	8.21	7.38	0.00	89.89	0.00	0.00
DA 268	8.12	5.51	4.39	67.85	0.00	0.00
DA 270	8.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

4.4. Pepsine Karşı Gelişimlerinin Belirlenmesi

Suşların pepsine karşı direnç özelliklerinin belirlenmesi amacıyla pH'sı 2.0 ve 3.0 olacak şekilde ayarlanan PBS tampona 3 mg/mL pepsin ilave edilmiştir. Düşük pH'ya karşı canlılıklarını koruyan 33 suşun pepsine karşı gelişimleri belirlenmiştir. pH 2.0'de yapılan denemede DA7, DA23, DA217, DA218 ve DA225 kodlu izolatlar 1. saatin sonunda canlı kalabilirken hiçbir izolat 3. saatin sonunda canlılığını koruyamamıştır. pH 3.0'de ise 3. saat sonunda en düşük canlılık oranı % 70 olarak tespit edilirken suşlarda 3. saatin sonunda ortalama 2.5 logaritmalık bir düşüş tespit edilmiştir. DA22 ve DA25 kodlu suşlar 1. saatin sonunda canlılıklarını yitirmişler ve bir sonraki denemeye alınmamışlardır.

Daniel vd., (2006) beş farklı *Lactobacillus* suşu ile *in vitro* ortamda yaptıkları mide denemesinde suşlar 20. dakikaya kadar % 65 ve üstünde canlılık oranı verirken 1. saatin sonunda bu oran en fazla % 39 olarak belirlenmiştir. Maragkoudakis vd., (2006) süt ürünlerinden izole ettikleri 29 adet *Lactobacillus* suşunun probiyotik olma özelliklerini incelemişlerdir. Bu amaçla yaptıkları mide denemelerinde pH'sı 2.0 olan fosfat buffer tampona 3 mg/mL olacak şekilde pepsin eklemiş ve 0., 1., ve 3. saatlerde canlılık tespiti yapmışlardır. 3. saatin sonunda suşlarda ortalama 2.5 logaritmalık bir düşüş gözlemlenmiştir. En iyi sonucu veren suşlar ise *L. rhamnosus* ve *L. paracasei* subsp. *paracasei* olmuştur. Cholakov vd., (2014) bozadan izole ettikleri *L. plantarum* BG24 izolatının probiyotik olma özelliklerini belirlemek amacıyla yaptıkları analizlerde. mide ortamı oluşturmak amacıyla pH 2.0'de 0.5% NaCl ve pepsin eklenmiş fosfat buffer tampona 0., 2., 4., 24. saatlerde canlılık tespiti yapmışlardır. 24 saatin sonunda 5 logaritmalık bir düşüş olduğu tespit edilmiştir. Teneva vd., (2015) salata sosundan izole ettikleri *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* TAB2 ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B1, suşlarının pH 2.0 + pepsine karşı canlılığını inceledikleri çalışmada her iki suşunda 2. saatin sonunda ortalama 6 kob/mL canlılık kayb ettiklerini tespit etmişlerdir. Ashraf ve Smith (2016) çalışmalarında on yedi farklı laktik asit bakterisinin probiyotik olma özelliklerini incelemişlerdir. Bu amaçla oluşturdukları mide ortamında (pH 2.0 ve pH 3.0) yedi farklı izolat % 55 ve üzerinde bir canlılık oranı göstermiştir. Zhang vd., (2016)'da yaptıkları çalışmada 69 *Lactobacillus* suşunu çiğ süttten yapılmış peynirden izole

etmiş ve probiyotik olma özelliklerini incelemişlerdir. Toplamda 29 suş pH 2.0 ve pH 3.0 'e karşı 2 saatin sonunda ortalama % 90 oranında canlılık göstermiştir.

Çalışma sonuçlarımız Maragkoudakis vd., (2006) ile paralellik göstermiştir. Teneva vd., (2015)'nin çalışmasında olduğu gibi izolatlarımızın pH 2.0'de yüksek bir canlılık kaybına uğradığı görülmüştür. Çizelge 4.5'de kültürlerin pH 2.0'de pepsine karşı gelişimleri Çizelge 4.6'da ise kültürlerin pH 3.0'de pepsine karşı gelişimleri verilmiştir. DA3, DA49 ve DA201 kodlu suşlar stoklarından aktiveleştirilememiştir. Kültürlerin canlılıklarını kaybettikleri düşünülmektedir.

Çizelge 4.5. Kültürlerin 3 mg/mL pepsin içeren pH 2.0 PBS tampondaki dirençlilik gelişimleri

Mikroorganizma Kod Numarası	0h.	1h.	3h.	0-1h. Canlılık %	1-3h. Canlılık %	0-3h. Canlılık %
DA 1	8.61	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 2	7.74	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 4	7.26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 7	8.07	5.92	0.00	73.35	0.00	0.00
DA 8	7.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 9	7.79	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 20	8.32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 22	7.45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 23	8.13	4.69	0.00	57.68	0.00	0.00
DA 25	8.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 28	8.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 29	8.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 100	7.81	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 116	7.92	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 134	8.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 135	8.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 136	7.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 140	7.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 142	7.57	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 161	7.43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 199	8.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 217	8.30	4.30	0.00	51.80	0.00	0.00
DA 218	8.60	3.00	0.00	34.88	0.00	0.00
DA 225	8.70	3.00	0.00	34.48	0.00	0.00
DA 242	8.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 245	6.69	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 254	8.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 255	8.60	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 256	8.77	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 260	8.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 263	8.77	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 267	8.61	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 268	8.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Çizelge 4.6. Kültürlerin 3mg/mL pepsin içeren pH 3.0 PBS tampondaki dirençlilik gelişimleri

Mikroorganizma Kod Numarası	0h.	1h.	3h.	0-1h. Canlılık %	1-3h. Canlılık %	0-3h. Canlılık %
DA 1	7.92	7.07	6.47	89.26	91.51	81.69
DA 2	7.84	7.59	7.55	96.81	99.47	96.30
DA 4	8.20	8.32	7.90	101.46	94.95	96.34
DA 7	7.32	7.44	7.44	101.63	100.00	101.63
DA 8	8.04	7.77	6.0	96.64	77.22	74.62
DA 9	7.95	7.72	7.81	97.10	101.16	98.23
DA 20	7.77	7.74	7.74	99.61	100.00	99.61
DA 22	7.93	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 23	8.17	7.27	5.74	88.98	78.95	70.25
DA 25	8.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DA 28	8.17	8.95	8.87	109.54	99.10	108.56
DA 29	7.56	7.23	0.00	95.63	0.00	0.00
DA 100	8.17	8.04	8.92	98.40	110.94	109.17
DA 116	7.84	5.00	0.00	63.77	0.00	0.00
DA 134	8.20	8.23	8.23	100.36	100	100.36
DA 135	7.65	8.87	8.00	115.94	90.19	104.57
DA 136	8.97	8.92	7.77	99.44	87.10	86.62
DA 140	8.04	7.47	7.77	92.91	104.01	96.64
DA 142	8.14	8.00	8.97	98.28	112.12	110.19
DA 161	8.30	5.47	0.00	65.90	0.00	0.00
DA 199	8.07	8.04	8.87	99.62	110.32	109.91
DA 217	8.11	8.95	7.11	110.35	79.44	87.66
DA 218	7.75	8.87	8.3	114.45	93.57	107.09
DA 225	7.23	7.69	7.59	106.36	98.69	104.97
DA 242	8.11	7.72	7.14	95.19	92.48	88.03
DA 245	8.17	8.47	8.57	103.67	101.18	104.86
DA 254	7.00	6.69	6.47	95.57	96.71	92.42
DA 255	8.00	7.84	7.23	98.0	92.21	90.37
DA 256	7.54	5.47	0.00	72.54	0.00	0.00
DA 260	7.23	7.84	5.84	108.43	74.48	80.77
DA 263	7.20	5.90	0.00	81.94	0.00	0.00
DA 267	8.00	6.77	5.81	84.62	85.81	72.62
DA 268	7.54	5.47	0.00	72.54	0.00	0.00

4.5. Pankreatine Karşı Gelişimin Belirlenmesi

Suşların pankreatine karşı direnç özelliklerinin belirlenmesi amacıyla pH'sı 8.0'e ayarlanan PBS tampona 1 mg/mL olacak şekilde pankreatin ilave edilmiştir. Bir önceki testte canlılığını koruyan 31 adet izolatın canlılıkları belirlenmiştir. Deneme sonunda izolatların 14 tanesi pankreatine karşı 4. saat sonunda %100 ve üzerinde canlılık oranına sahip iken DA2, DA7, DA254 ve DA267 nolu suşlar 4. saatin sonunda canlılık gösterememişlerdir.

Denkova vd., (2012) hamur mayasından izole ettikleri *L. acidophilus* Z10 suşunu pH 4.5 + pankreatin ve pH 7.0 + pankreatin olmak üzere iki farklı ortama tabi tutmuşlardır. 0., 2., 4., ve 24. saatlerde yaptıkları canlılık tespiti sonucunda pH 4.5 + pankreatin içeren ortamda 2.8 logaritmalık düşüş, pH 7 + pankreatinli ortamda ise 2.4 logaritmalık düşüş olmuştur. Balamurugan vd., (2014) kaymaktan izole ettikleri 12 adet *Lactobacillus* suşunun probiyotik olma özelliklerini incelemişlerdir. Bu amaçla pH 8.0'de 1 mg/mL olacak şekilde MRS sıvı besiyerinde 4 saat süre ile gelişimleri incelenmiştir. Suşların tamamı bu koşullarda canlı kalmayı başarmıştır. Tokatlı vd., (2015) karışık turşudan izole ettikleri 21 adet *L. plantarum*, 11 adet *P. ethanolidurans* ve 7 adet *L. brevis* suşlarının probiyotik olma özelliklerini tespit etmek amacıyla yaptıkları pankreatine dirençlilik testinde 1mg/mL olacak şekilde pH 8.0'de fosfat buffer tamponda 4 saatlik inkübasyonun sonunda en fazla % 63 canlılık oranı göstermişlerdir.

Elde edilen sonuçlar yüksek canlılık oranını ağırlıklı olarak peynirlerden elde edilen izolatlarda olduğunu göstermiştir. Ancak diğer izolatlarda da en fazla 1 logaritmalık düşüş olduğu belirlenmiştir. Yapılan diğer çalışmalar ile kıyaslandığında izolatların pankreatine karşı oldukça iyi gelişim düzeyine sahip oldukları belirlenmiştir. Çizelge 4.7'de kültürlerin 1 mg/mL pankreatine karşı sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.7. Kütürlerin 1mg/mL pankreatine karşı gelişim sonuçları

Mikroorganizma Kod Numarası	0h.	4h.	0-4h. Canlılık %
DA 1	8.07	7.84	97.15
DA2	8.00	0.00	0.00
DA 4	8.23	8.17	99.27
DA 7	8.00	0.00	0.00
DA 8	8.04	8.27	102.86
DA 9	8.25	8.39	101.70
DA 20	8.00	8.00	100.00
DA 23	8.39	8.39	100.00
DA 28	8.47	8.32	98.23
DA 29	8.49	8.34	98.23
DA 100	8.39	8.41	100.24
DA 116	8.30	8.00	96.39
DA 134	8.54	8.70	101.87
DA 135	8.51	8.43	99.06
DA 136	8.68	8.68	100.00
DA 140	8.51	8.17	96.00
DA 142	8.54	8.39	98.24
DA 161	8.00	8.23	102.88
DA 199	8.00	8.81	110.13
DA 217	8.47	8.60	101.53
DA 218	8.14	8.30	101.97
DA 225	8.30	8.14	98.07
DA 242	8.04	8.17	101.62
DA 245	8.54	8.30	97.19
DA 254	8.00	0.00	0.00
DA 255	8.47	8.39	99.06
DA 256	7.81	8.07	103.33
DA 260	8.65	8.30	95.95
DA 263	7.76	7.92	102.06
DA 267	7.81	0.00	0.00
DA 268	7.83	7.70	98.34

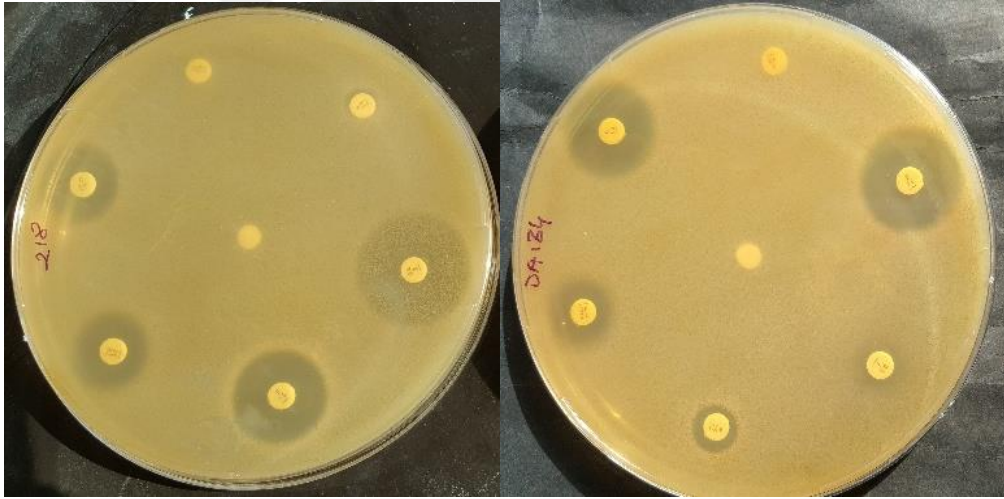
4.6. Antibiyotik Direnci

Çalışmamızda 27 adet laktobasil suşunun antibiyotik direnci disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Antibiyotiklerin etki mekanizmaları göz önüne alınarak yapılan değerlendirme yapılmıştır. Bu değerlendirme sonucunda izolatlar, hücre sentezini inhibe eden antibiyotiklerden penisiline karşı % 48.1 i dirençli, % 33.3'ü orta derecede duyarlı % 18'i ise duyarlıdır. Ampisiline karşı suşların % 81.5'i duyarlı iken metisiline karşı % 96.3'ü dirençli bulunmuştur. Basitrasine suşların % 59.3'ü dirençlidir. Amoksillin klavanik asite karşı suşların % 85.1'i duyarlı iken 27 suşun tamamı vankomisin ve teikoplanine karşı dirençli bulunmuşlardır. Çizelge 4.8'de kültürlerin antibiyotik dirençlilik sonuçları verilmiştir.

Charteris vd., (1998) çalışmasında insan ve farklı süt ürünlerinden izole edilmiş 46 laktobasil suşunun 44 farklı antibiyotiğe karşı dirençliliğini belirlemişlerdir. Suşların tamamı kanamisin. streptomisin. norfloksasin. gentamisin. amikasin. sefoksitin. polimiksin. aztreonam'a karşı dirençli iken tetrasiklin. kloramfenikol. rifampisine karşı duyarlı bulunmuşlardır. Gad vd., (2014) çalışmasında 244 adet laktik asit bakterisinin antibiyotik dirençliliklerini belirlemişlerdir. *Lactobacillus* spp. suşların % 20.3'ü penisiline karşı dirençli, sephalexin'e karşı orta derecede duyarlı, sefoperazon'a ise duyarlı bulunmuşlardır. *Lactobasillus* suşlarının % 40.6'sı vankomisine ve % 17.4'si streptomisine dirençli bulunmuşlardır. Laktokok ve Streptokok izolatların tamamı ise vankomisine karşı duyarlı bulunmuştur. Sharma vd., (2016) çalışmasında *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. plantarum* ve *L. fermentum*dan oluşan 30 adet laktobasil suşunun antibiyotik dirençliliklerini incelemişlerdir. Nalidisik asit, vankomisin, kanamisin, teikoplanin, amikasin, streptomisin, norfloksasin, cefepime ve nitrofurantoin'e karşı dirençli bulunurken cefatrixon, ceftazidim, cefadroxil, cefotaxime, sephalotonin, sefoperazone ve netillin'e karşı ağırlıklı olarak duyarlı bulunmuşlardır. Ashraf ve Smith (2016) çalışmalarında on yedi farklı laktik asit bakterisinin probiyotik olma özelliklerini incelemişlerdir. Tüm suşlar ampisilin ve eritromisine karşı duyarlı bulunurken vankomisin ve streptomisin toleransı, gentamisin, klindamisin ve tetrasikline oranla daha yüksek bulunmuştur. Bu toleransların antibiyotik tedavisinden sonra bağırsak kolonizasyonu ve yenilemesi sırasında suşlara fayda sağlayabileceğini düşünmüşlerdir. Wolupeck vd., (2017) çalışmasında sosisden izole

edilmiş 57 adet *L. plantarum* suşunun disk difüzyon ve MIC yöntemleri ile antibiyotik dirençlilik özelliklerini belirlemişlerdir. En yüksek dirençlilikler streptomisin ve ampisiline karşı bulunurken en yüksek duyarlılık ise tetrasiklin, kloramfenikol ve penisilin G'ye karşı bulunmuştur.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, Wolupeck vd., (2017) çalışmasına kıyasla izolatlarımız penisiline karşı yüksek bir direnç gösterirken, Vankomisin ve streptomisin dirençliliği Wolupeck vd., (2017) ile Sharma vd., (2015) çalışmaları ile paralellik göstermiştir. izolatların tamamının vankomisine dirençli olmasının *Lactobacillus* suşlarının bu antibiyotiğe karşı doğal dirençli olduklarını düşünmemize neden olmuştur. Şekil 4.1'de *Lactobacillus fermentum* DA134 ve *Lactobacillus plantarum* DA218 suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları verilmiştir.



Şekil 4.1. *Lactobacillus plantarum* DA218 ve *Lactobacillus fermentum* DA134 suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları

DA20, DA23, DA28, DA100, DA116, DA217 ve DA263 kodlu izolatların kontrol amacıyla 24. saatte yapılan incelemesinde klindamisine (DA) karşı direnç geliştirdikleri görülmüştür. Bu izolatlar ağırlıklı olarak peynirden izole edilmişlerdir. Bunun Klindamisin'in süt hayvanlarının tedavisinde sıkça kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çizelge 4.9'da İzolatlarının antibiyotik duyarlılık ve dirençlilik yüzdeleri verilmiştir.

Çizelge 4.8. Kültürlerin antibiyotik dirençlilik sonuçları

	Hücre Sentezini İnhibe Edenler							Protein Sentezini İnhibe Edenler							DNA Replikasyonunu İnhibe Edenler		
	P	AM	ME	VA	B	AMC	TEC	TE	S	K	N	CN	C	DA	E	NA	CIP
DA1	R	S**	R	R	R	S	R	I	R	R	R	R	S	S	S	R	R
DA4	S	S	R	R	R	S	R	I	R	R	R	R	I	S	S	R	R
DA8	R	S	S	R	S	R	R	S	R	R	I	R	S	S	S	R	R
DA9	R	S	R	R	S	S	R	R	R	I	I	S	S	R	S	R	R
DA20	I	S	R	R	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R
DA23	S	I	R	R	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R
DA28	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	I	R	S	S	S	R	R
DA29	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R
DA100	R	S	R	R	R	S	R	I	R	R	R	R	S	S	S	R	R
DA116	I	S	R	R	R	S	R	I	R	R	R	R	S	S	S	R	R
DA134	I	S	R	R	R	S	R	I	R	R	R	R	S	R	S	R	R
DA135	R	S	R	R	R	S	R	I	R	R	R	R	S	R	S	R	R
DA136	R	S	R	R	R	S	R	I	R	R	R	R	S	S	S	R	R
DA140	R	S	R	R	R	S	R	I	R	R	R	R	I	S	S	R	R
DA142	R	S	R	R	R	S	R	I	R	R	R	R	S	S	S	R	R
DA161	I	I	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R
DA199	R	S	R	R	R	S	R	I	R	R	R	R	S	R	S	R	R
DA217	R	S	R	R	R	S	R	I	R	R	R	R	I	S	S	R	R
DA218	R	S	R	R	R	S	R	I	R	R	R	R	S	S	S	R	R

AMP: Ampisilin (10 µg). E: Eritromisin (15 µg).CN: Gentamisin (10 µg). C: Kloramfenikol (30 µg). ME: Metisilin (5 µg). K: Kanamisin (30 µg). S: Streptomisin (30 µg). DA: Klindamisin (2 µg). N: Neomisin (30 µg). P: Penisilin G (10 U). AMC: Amoxycillin-clavulanic acid (30 µg). CIP: Siprofloksasin (5 µg). TEC: Teikoplanin (30 µg). TE: Tetrasiklin (30 µg). NA: Nalidisik asit (30 mg). B: Basitrasin (10 U). VA: Vankomisin (30 µg) **S: Duyarlı; I: Orta seviyede dirençli; R: Dirençli

Çizelge 4.8. Kültürlerin antibiyotik dirençlilik sonuçları (Devam)

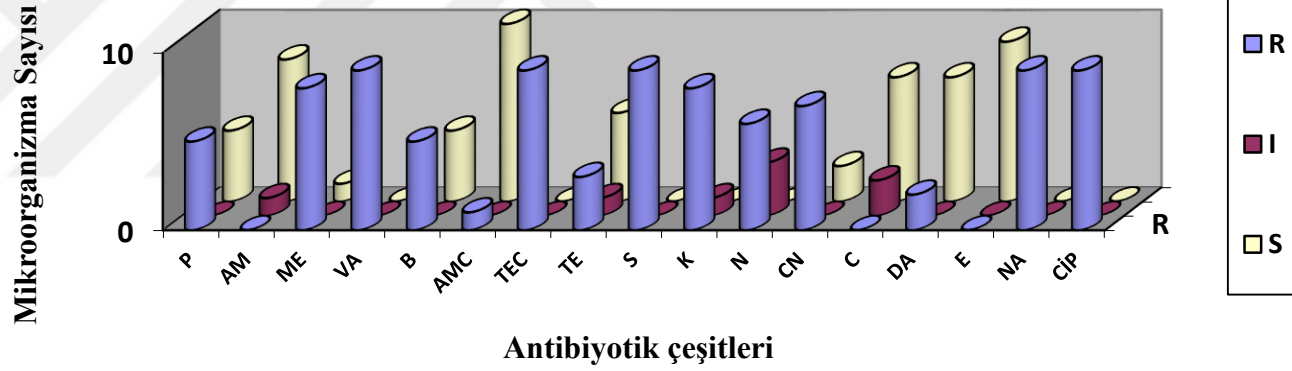
	Hücre Sentezini İnhibe Edenler								Protein Sentezini İnhibe Edenler						DNA Replikasyonunu İnhibe Edenler		
DA225	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R
DA242	R	I	R	R	I	I	R	I	R	R	R	R	R	R	S	R	R
DA245	S	I	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S
DA255	I	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R
DA256	I	S	R	R	S	S	R	S	R	R	S	R	R	S	I	R	R
DA260	R	I	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	I	R	I	R	R
DA263	I	S	R	R	S	S	R	I	R	R	R	R	S	S	I	R	R
DA268	I	S	R	R	S	I	R	I	R	R	R	R	S	S	S	R	R

AMP: Ampisilin (10 µg). E: Eritromisin (15 µg).CN: Gentamisin (10 µg). C: Kloramfenikol (30 µg). ME: Metisilin (5 µg). K: Kanamisin (30 µg). S: Streptomisin (30 µg). DA: Klindamisin (2 µg). N: Neomisin (30 µg). P: Penisilin G (10 U). AMC: Amoxycillin-clavulanic acid (30 µg). CIP: Siprofloksasin (5 µg). TEC: Teikoplanin (30 µg). TE: Tetrasiklin (30 µg). NA: Nalidisik asit (30 mg). B: Basitrasin (10 U). VA: Vankomisin (30 µg) **S: Duyarlı; I: Orta seviyede dirençli; R: Dirençli

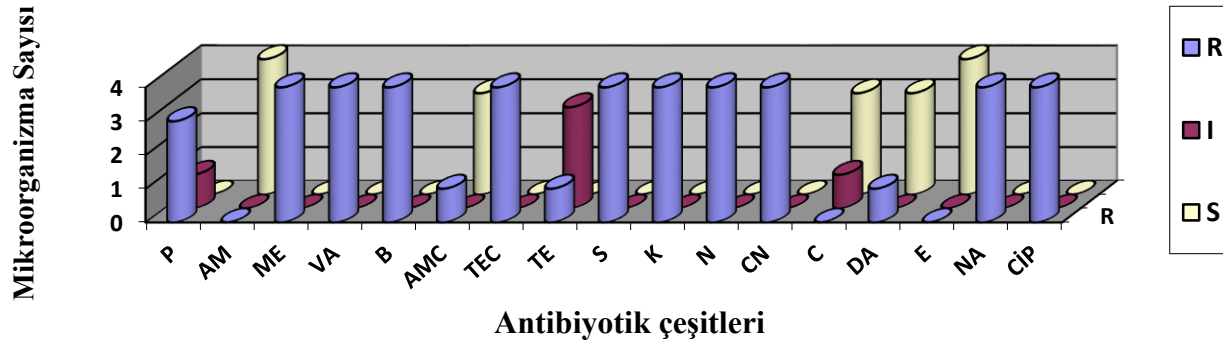
Çizelge 4.9. İzolatların antibiyotik duyarlılık ve dirençlilik yüzdeleri

Antibiyotikler	*S		I		R	
	<i>n</i> **	%	<i>n</i> **	%	<i>n</i> **	%
Penisilin G	5	18.50	9	33.30	13	48.10
Ampisilin	22	81.50	5	18.50	-	0.00
Metisilin	1	3.70	-	0.00	26	96.30
Vankomisin	-	0.00	-	0.00	27	100.00
Basitrasin	10	37.00	1	3.70	16	59.30
Amoxicillin-clavulanic acid	23	85.10	2	7.40	2	7.40
Teikoplanin	-	0.00	-	0.00	27	100.00
Tetrasiklin	5	18.50	15	55.50	7	26.00
Streptomisin	-	0.00	-	0.00	27	100.00
Kanamisin	-	0.00	1	3.70	26	96.30
Neomisin	1	3.70	3	11.10	23	85.20
Gentamisin	3	11.10	-	0.00	24	88.90
Kloramfenikol	21	77.80	4	14.80	2	7.40
Klindamisin	20	74.00	-	0.00	7	26.00
Eritromisin	-	0.00	4	14.80	23	85.20
Nalidisik asit	-	0.00	-	0.00	27	100.00
Siprofloksasin	1	3.70	-	0.00	26	96.30

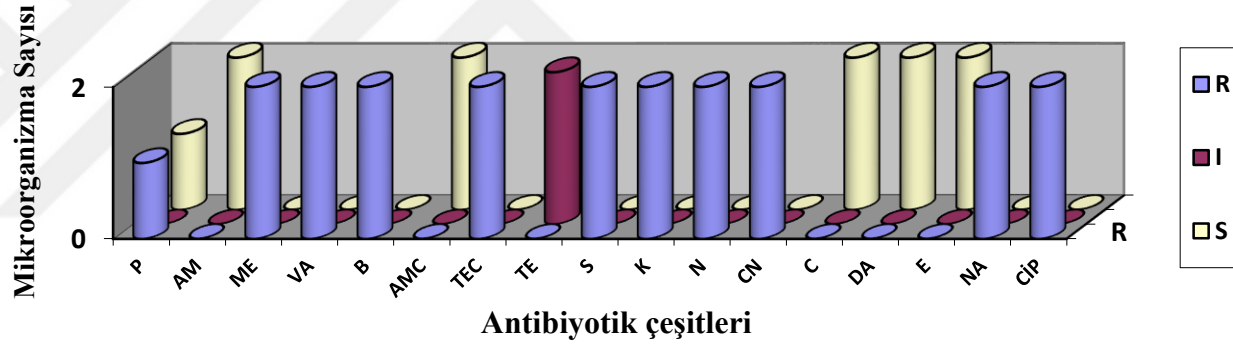
*S: Duyarlı. I:Orta seviyede dirençli. R: Dirençli ***n*: İzolat sayısı



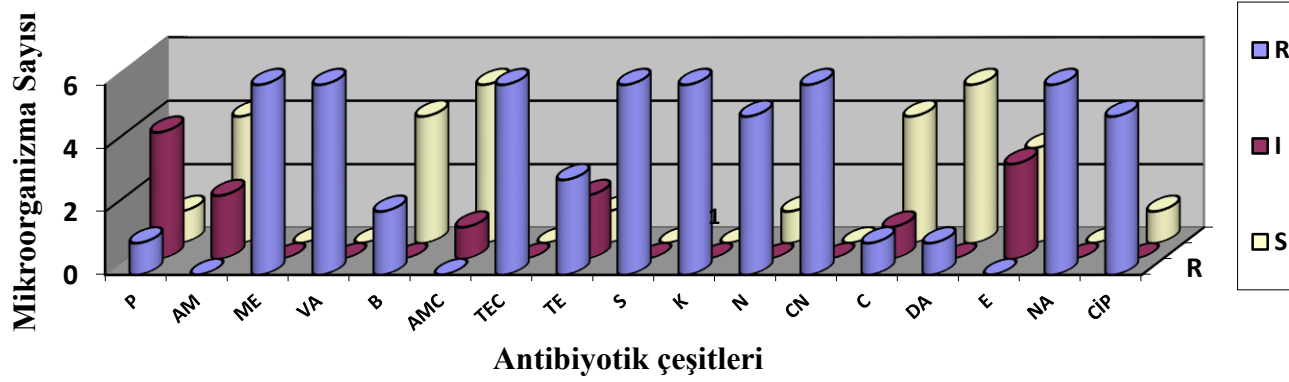
Şekil 4.2 Tulum peynirinden elde edilen izolatların antibiyotik dirençlilik sonuçları



Şekil 4.3. Sucuk örneklerinden elde edilen izolatların antibiyotik dirençlilik sonuçları

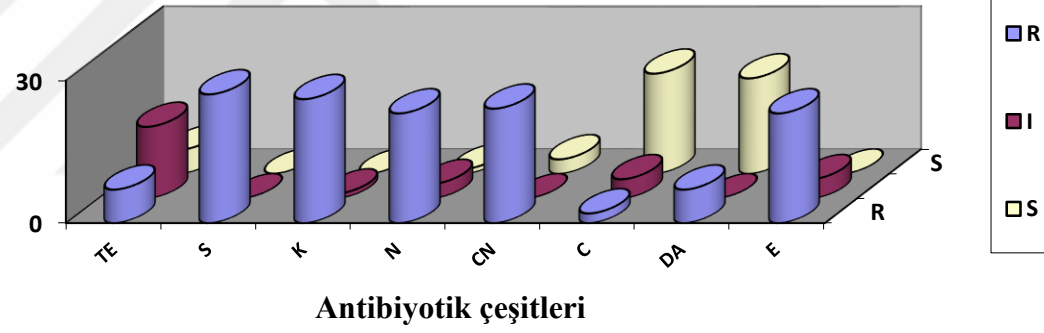


Şekil 4.4. Turşu örneklerinden elde edilen izolatların antibiyotik dirençlilik sonuçları

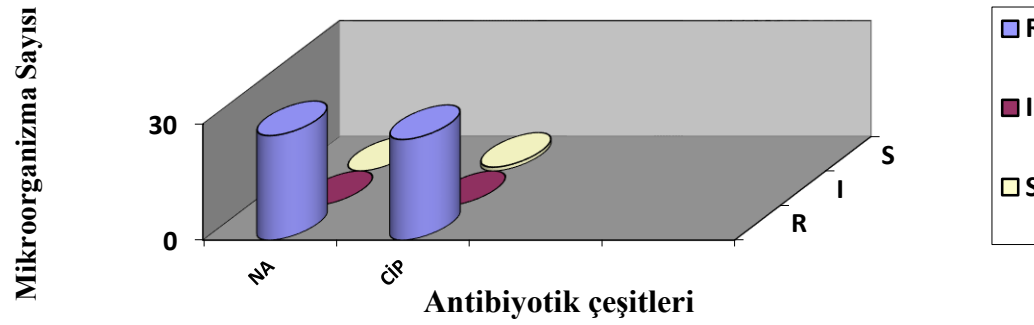


Şekil 4.5. Bitki örneklerinden elde edilen izolatların antibiyotik dirençlilik sonuçları

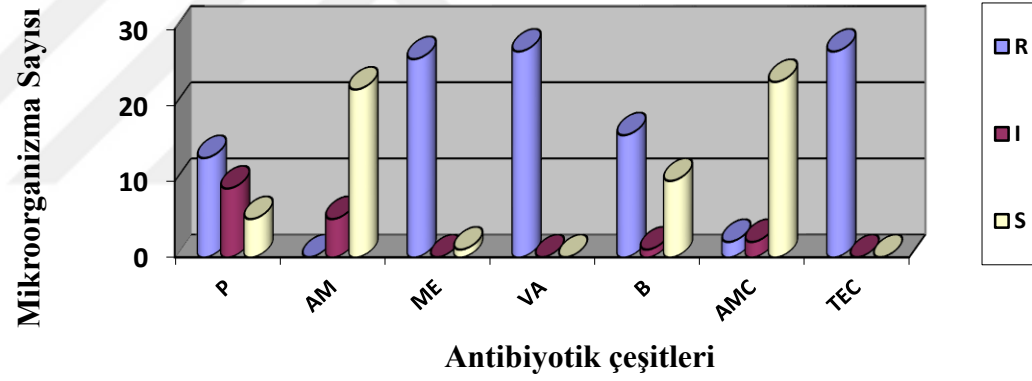
Mikroorganizma Sayısı



Şekil 4.6. Protein sentezini inhibe eden antibiyotiklere karşı izolatların sonuçları



Şekil 4.7. DNA replikasyonunu inhibe eden antibiyotiklere karşı izolatların sonuçları



Şekil 4.8. Hücre sentezini inhibe eden antibiyotiklere karşı izolatların sonuçları

4.7. Lizozim Direnci

Probiyotik mikroorganizmaların sağlığa faydalı etki gösterebilmeleri için, canlı olarak ve yeterli sayıda bağırsağa ulaşmaları gerekmektedir. Ayrıca mide sıvısında bulunan başlıca inorganik maddeler; anyon olarak Cl^- , HCO_3^- , PO_4^{3-} ve SO_4^{2-} ; kation olarak ise H^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{+2} ve Mg^{+2} 'dir. Ayrıca mukus, pepsin, intrinsik faktör, gastrik lipaz, nükleazlar, rennin (kimoziin), lizozim, LDH, üreaz ve karbonik anhidraz mide sıvısında bulunan organik maddeleri oluşturmaktadır. Serum proteinleri arasında yer alan lizozim enzimi, bakteri hücre duvarında bulunan N-asetil müramik asit ile N-asetil glikozamin arasındaki β -1.4 glikozidik bağı parçalayarak bakterilerin lize olmasına yol açan antimikrobiyal bir enzimdir (Akman 1967; Gür vd., 2010; Sudağıdan, 2013). Lizozim insan vücudunda da biyolojik sıvılarda örneğin serum, tükürük ve mukus gibi noktalarda 1-13 mg/mL aralığında bulunmaktadır. Farklı kaynaklardan izole edilmiş *Lactobacillus* türlerinin lizozim direncinin 0.1-10 mg/mL lizozimde orta ila yüksek direnç (% 3.24-99.97) gösterdiği bilinmektedir (Gilez-Gomez vd., 2016).

Bu amaçla tez çalışmamızda incelenen özelliklerden biriside lizozim enzimine olan dirençdir. Çalışmada 27 adet laktik asit bakterisinin tamamı 100 mg/L lizozime karşı 90 dakika sonunda canlılıklarını korumuşlardır. Canlılık yüzdeleri % 75.90 ile % 107.80 arasında belirlenmiştir.

Dias vd., (2015) çalışmasında şaraptan izole edilen Laktobasiller üzerinde lizozimin etkisini incelemiştir. *L. hilgardii*, *L. collinoides* ve *L. fructivorans* suşları 200 mg/L lizozim konsantrasyonuna dirençli bulunmuştur. Riaz vd., (2015) çalışmasında çeşitli fermente süt ürünlerinden izole ettiği *Lactobasillus* suşlarının farklı konsantrasyonlardaki (200 μ g/L, 300 μ g/L, 400 μ g/L, 500 μ g/L) lizozim dirençliliğini belirlemiştir. Suşlar 200 μ g/L, 300 μ g/L lizozimde yüksek oranda canlılık göstermişlerdir. Tomáška vd., (2015) *L. casei* 21L10, *L. johnsonii* KB2-1 ve *L. plantarum* 25/1L suşlarının 400 mg/L lizozimdeki dirençliliklerini belirlemiştir. *L. plantarum* 25/1L suşu duyarlı bulunurken diğer iki suş canlılıklarını korumuşlardır. 27 adet izolatin tamamı 100 mg/L lizozim'e karşı canlılıklarını korumuşlardır. Giles-Gómez vd., (2016) çalışmasında geleneksel Meksika içkisinden izole ettikleri *L. mesenteroides* suşunun lizozime olan direncini

belirlemiş sonuçlarını *L. casei* ile kıyaslamışlardır. 100 mg/L lizozime karşı 30. dakikada *L. mesenteroides* % 89.56. 120. dak 'da ise % 70.71 canlılık verirken *L. casei* % 99.84 ve % 89.14 vermiştir. Rajoka vd., (2018) çalışmasında kümes hayvanlarının bağırsaklarından izole edip tanımladıkları 13 adet laktobasil suşunun probiyotik olma özelliklerini incelemişlerdir. Bu amaçla yaptıkları lizozime direnç testinde suşlar 100 mg/L lizozime karşı 120. dakikada % 70 ile % 90 arasında canlılık oranı vermişlerdir. En iyi sonuçlar *L. reuteri* SHA103, *L. vaginalis* SHA110 suşlarından elde edilmiştir. Çizelge 4.10'da izolatların 100 mg/L lizozime karşı canlılık düzeyleri verilmiştir.



Çizelge 4.10. İzolatların 100 mg/L lizozime karşı canlılık düzeyleri

Mikroorganizma Kod Numarası	0h.	90 dak.	0-90 dak. Canlılık %
DA1	8.11	8.20	101.10
DA4	8.23	8.43	102.43
DA8	8.20	7.77	94.75
DA9	8.60	8.20	95.34
DA20	8.17	7.47	91.43
DA23	8.00	6.77	84.62
DA28	7.56	6.60	87.30
DA29	8.60	8.41	97.79
DA100	7.11	6.90	97.04
DA116	7.54	6.60	87.53
DA134	8.30	8.34	100.48
DA135	7.00	7.47	106.71
DA136	8.04	7.78	96.76
DA140	8.34	8.47	101.55
DA142	8.39	8.00	95.35
DA161	7.84	8.20	104.59
DA199	8.14	7.90	97.05
DA217	8.04	8.20	101.99
DA218	7.69	6.77	88.036
DA225	8.17	7.77	95.10
DA242	8.07	8.34	103.34
DA245	8.14	8.20	100.73
DA255	8.62	8.54	99.07
DA256	8.30	6.30	75.90
DA260	8.39	8.47	100.95
DA263	8.23	7.90	95.99
DA268	7.30	7.87	107.80

4.8. Fenol Dirençliliği

Tez çalışmasında diğer testlerden canlılık gösteren izolatların fenol direncini belirlemek amacıyla % 0.3 fenolde deneme yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda toplamda 27 mikroorganizma yüksek canlılık oranı göstererek hayatta kalmıştır. Çalışma sonunda izolatlardan DA9 ve DA161 24. saat sonunda canlılıklarını kaybederken diğer izolatlar ortalama 1 logaritmalık düşüş göstermişlerdir. Bu durum yapılan çalışmalar ile paralellik göstermektedir. Çizelge 4.12’de izolatların fenol dirençliliği sonuçları verilmiştir.

Enterobacteriaceae, *Peptostreptococcus*, *Clostridia* ve *Eupacteria* gibi bağırsakta bulunan mikroorganizmalar üre üretebilmektedirler. Bu maddenin hidrolizi sonucu ortaya amonyak, fenol, farmakolojik olarak aktif maddeler ve indol aminler gibi potansiyel olarak zehirli maddeler açığa çıkmaktadır (Pozza vd., 2011). Bu fenolikler laktik asit bakterilerinin gelişimi üzerine olumsuz etki oluşturabilmektedirler (Yadav vd., 2016). Probiyotik mikroorganizmalar. bağırsak sisteminde bulunabilen bu maddelerin bazılarını inaktive ederek veya inhibe ederek immün yanıtı teşvik etmektedir. Bunu prokanserojenleri kanserojene çeviren nitro-redüktaz. Azoredüktaz ve beta-glukuronidaz gibi enzim aktivitelerini redükte ederek yaptıkları ya da diyetle bulunan proteinlerinden türetilen ve fenollerin oluşumuna yol açabilen aromatik amino asitleri deamine ederek engelledikleri düşünülmektedir (Can, 2007; Yadav vd., 2016). Bu nedenle probiyotik özellik gösterecek mikroorganizmaların fenol direnci taşıması önemlidir.

Pozza vd., (2011) 10 farklı laktobasil suşunun % 0.3 fenole karşı direnç özelliğini incelemişlerdir. Suşlar % 0.3 v/v fenol konsantrasyonunda gelişim göstermiştir. Kılıç vd., (2013) çalışmasında 20 adet laktobasil suşunun probiyotik olma özelliklerini belirlemişlerdir. Bu amaçla yapılan % 0.4 fenol direnç analizi sonucunda izolatların büyük bir çoğunluğu yüksek bir canlılık oranı göstermiştir. Sadrani vd., (2014) fermente gıdalar, meyveler ve insandan izole ettikleri laktobasil suşlarının % 0.4 ve % 0.6 oranında fenolü skimmilk’e ekleyerek fenole karşı dirençliliğini tespit etmişlerdir. Suşların tamamı % 0.4 fenolde yüksek canlılık oranı gösterirken % 0.6 fenolde 5 yalnızca mikroorganizma hayatta kalmayı başarmıştır. Yadav vd., (2016)

yerel içeceklerinden izole ettikleri *L. plantarum* suşlarının fenole dirençliliğini belirlemek amacıyla MRS sıvı besiyerine % 0.4 fenol ekleyerek 0. ve 24. saatlerdeki canlılıklarını tespit etmişlerdir. Çalışma sonunda 6 izolattan 2'si inhibe olurken RYPR1 kodlu izolat oldukça yüksek bir canlılık oranı yakalamıştır. Ayrıca yapılan farklı çalışmalar sonucunda % 0.5 v/v fenol konsantrasyonunda laktobasillerin tam inhibisyona uğradığı % 0.4 v/v fenol varlığında ise bakteriyostatik bir etki olduğu görülmüştür (Pozza vd., 2011).

Yapılan analizler sonucunda toplamda 27 mikroorganizma yüksek canlılık oranı göstererek hayatta kalmıştır. Bu mikroorganizmalardan bağırsak hücrelerine tutunma ve patojenlerin tutunmalarını engelleme yeteneklerinin belirlenmesi için yapılacak analizlerde kullanılmak üzere seçim yapılmıştır. Bu seçim için mikroorganizmaların öncelikle yapılan analizlerde sahip oldukları canlılık yüzdeleri göz önünde bulundurulmuştur. Ayrıca aynı gıda örneklerinden elde edilen izolatların mikroskop görüntüleri tekrar incelenmiş her analiz için alınan sonuçlar tekrar değerlendirilmiştir. Seçilen 15 adet mikroorganizmaya 16S mikrobiyal tanımlama analizi GEN Plaza Biyoteknoloji Merkezi tarafından yapılmıştır. Bu yöntemle göre tanımlanan izolatlar Çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Moleküler tanısı yapılan suşların listesi

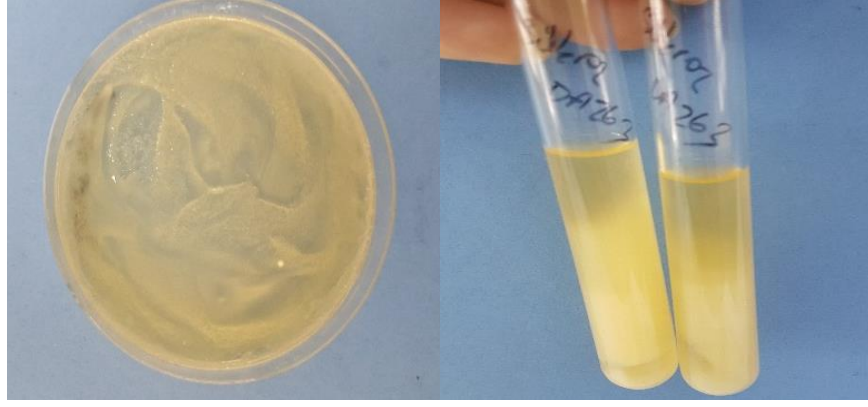
İzolat Kodu	16S Mikrobiyal Tanımlama Analizi Sonucu
DA4	<i>Lactobacillus casei</i> DA4
DA8	<i>Weissella cibaria</i> DA8
DA28	<i>Weissella cibaria</i> DA28
DA100	<i>Lactobacillus plantarum</i> DA100
DA134	<i>Lactobacillus fermentum</i> DA134
DA135	<i>Lactobacillus plantarum</i> DA135
DA140	<i>Lactobacillus plantarum</i> DA140
DA199	<i>Lactobacillus plantarum</i> DA199
DA218	<i>Lactobacillus plantarum</i> DA218
DA225	<i>Lactobacillus plantarum</i> DA225
DA245	<i>Lactobacillus plantarum</i> DA245
DA255	<i>Lactobacillus plantarum</i> DA255
DA256	<i>Lactobacillus coryniformis</i> DA256
DA263	<i>Lactobacillus coryniformis</i> DA263
DA268	<i>Leuconostoc lactis</i> DA268

Çizelge 4.12. İzolatların % 0.3 fenole karşı canlılık sonuçları

Mikroorganizma Kod Numarası	0h.	24h.	0-24h. canlılık%
DA1	8.06	6.00	74.44
DA4	7.81	6.77	86.68
DA 8	7.91	4.69	59.29
DA9	7.30	0.00	0.00
DA20	6.69	4.00	59.79
DA 23	7.20	5.00	69.44
DA28	8.20	6.69	81.58
DA29	7.60	6.69	88.02
DA100	7.93	6.77	85.37
DA 116	8.39	6.00	71.51
DA 134	8.17	6.00	73.43
DA 135	6.30	6.77	107.46
DA 136	7.20	6.77	94.02
DA 140	8.70	6.77	77.81
DA 142	8.00	5.90	73.75
DA 161	7.00	0.00	0.00
DA 199	7.20	6.77	94.02
DA 217	8.06	6.69	83.00
DA 218	8.32	6.77	81.37
DA 225	8.30	8.00	96.38
DA 242	7.93	6.77	85.37
DA 245	8.23	6.77	82.26
DA 255	7.99	6.00	75.09
DA 256	8.14	6.69	82.18
DA 260	7.91	6.30	79.64
DA 263	7.20	6.69	92.91
DA 268	8.34	4.87	58.39

4.9. Ekzopolisakkarit Üretimi

Ekzopolisakkarit üretimini belirlemek amacıyla yapılan analiz sonucunda 15 adet izolattan 9 tanesi sakkaroz içeren MRS katı besiyerinde parlak, mukoz bir yapı üretmişlerdir. Şekil 4.9'da *L. plantarum* DA255 ve *L. coryniformis* DA263 izolatların sakkaroz içeren MRSA ve MRS sıvı besiyerinde oluşturdukları parlak, mukoz yapı gösterilmektedir.



Şekil 4.9. *L. plantarum* DA255 ve *L. coryniformis* DA263 izolatların oluşturduğu parlak, mukoz yapı

İzolatların ürettiği EPS miktarı 11.9 ile 1.1 mg/L arasında belirlenmiştir. Dut bitkisinden izole edilen *L. plantarum* DA255 suşu 11.9 mg/L ile en yüksek EPS üreticisi olarak belirlenmiştir. Ardından turşudan izole edilen *L. plantarum* DA100 izolatu 9 mg/L verirken en düşük miktar beyaz peynirden izole edilen *L. fermentum* DA134 suşunda 1.1 mg/L olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.13’de izolatların ürettiği EPS miktarları mg/L olarak verilmiştir.

Çizelge 4.13. İzolatların ürettiği EPS miktarları (mg/L)

Mikroorganizma	EPS miktarı (mg/L)
<i>W. cibaria</i> DA8	2.95
<i>W. cibaria</i> DA28	2.40
<i>L. plantarum</i> DA100	9.00
<i>L. fermentum</i> DA134	1.10
<i>L. plantarum</i> DA140	2.40
<i>L. plantarum</i> DA199	2.80
<i>L. plantarum</i> DA245	5.00
<i>L. plantarum</i> DA255	11.90
<i>L. coryniformis</i> DA263	4.90

Van Geel-Schutten vd., (1998) çalışmalarında 182 adet *Lactobacillus* suşundan 60 tanesinin EPS ürettiğini, bunlardan 17 suşun EPS üretiminin 100 mg/L’den fazla olduğu belirlemişlerdir. Ayrıca çalışma sonunda EPS üretimi için en uygun bileşenin sakkaroz olduğunu kaydetmişlerdir. Feng vd., (2012) çalışmasında Çin’e özel çeşitli geleneksel fermente gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin EPS üretimlerini belirlemişlerdir. En yüksek EPS üretim kapasitesi (0.859 g/L) *L. plantarum* (HQ259238) suşundan elde etmişlerdir. Dilna vd., (2015) çalışmasında laktik asit

bakterilerinin uygun koşullar sağlandığında EPS üretimi için yararlı olacağını düşünmüşlerdir. Bu amaçla yaptıkları çalışmada *L. plantarum* RJF4 suşu yapısında glukoz ve mannoz içeren bir heteropolisakkariti 3.5 g/L düzeyinde üretmiştir. Wang vd., (2015) çalışmasında kefirde izole ettikleri *L. plantarum* YW32 suşunun EPS üretimini ve yapısını belirlemişlerdir. *L. plantarum* YW32 tarafından üretilen EPS yaklaşık sırasıyla 8.2:1:4.1:4.2'lik mol oranında mannoz, früktoz, galaktoz ve glukozdan oluşmuştur. Ayrıca oluşan EPS'nin 1.03×10^5 Da'lık bir molekül ağırlığına sahip olduğunu belirlemişlerdir. Üretilen EPS'nin yüksek sıcaklığa (283.5°C) ksidroksil ve süperoksit radikallerine karşı antioksidan aktiviteye ve bazı patojen bakteriler üzerinde antibiofilm aktivitesi ile insan HT-29 hücrelerine karşı antitümör aktivitesine sahip olduğunu belirlemişlerdir. Demir vd., (2017) yoğurttan izole ettikleri laktik asit bakterilerinin EPS üretimlerini belirlemişler ve bakterilerin EPS üretim miktarları 5.89 ile 134.60 mg/L arasında tespit etmişlerdir.

4.10. Kolesterol Asimilasyon Yetenekleri

Bazı *Lactobacillus* veya *Bifidobacterium* içeren fermente süt ürünlerinin tüketilmesinin, insanlarda serum kolesterol düzeylerini düşürdüğü iddia edilmektedir (Burhan vd., 2017). Tez kapsamında probiyotik özellikler taşıdığı düşünülen 15 adet laktik asit bakterisinin % 0.3 safra tuzu ve % 2 kolesterol varlığında kolesterol asimilasyon yetenekleri belirlenmiştir. İzolatların toplam kolesterol asimilasyon yüzdeleri % 60.71 ile % 16.71 arasında değişmektedir. EPS üreticisi olmayan *L. lactis* DA268 % 60.71 ile en yüksek asimilasyonu sağlamıştır. *L. plantarum* DA245 suşu ise iyi bir EPS üreticisi olmasına karşın kolesterol asimilasyon yüzdesi % 16.71 olarak bulunmuştur. Çizelge 4'de izolatların kolesterol asimilasyon yüzdeleri ve miktarları verilmiştir.

Anandharaj ve Sivasankari (2015) çalışmalarında anne sütünden izole ettikleri laktobasil suşlarının farklı kolesterol miktarlarında ve safra tuzu varlığında/yokluğunda asimilasyon özelliklerini belirlemişlerdir. Suşlar safra tuzu yokluğunda % 23.28-35.41 mg/mL aralığında kolesterol asimile ederken % 0.3 safra tuzu varlığında en yüksek değer % 61.05 mg/mL olarak belirlenmiştir. Lertcanawanichakul vd., (2015) *Pediococcus plantarum* L14/1, *P. acidilactici* L25, *L. plantarum* L26, *L. pentosus*, *E. faecium* N15 suşlarının kolesterol asimilasyon

özelliklerini belirlemişlerdir. Suşlar % 0.3 safra tuzu varlığında iyi bir düşüş göstermişlerdir. *E. faecium* N15 suşu safra tuzu varlığında % 64.88 düşüş sağlarken safra tuzu yokluğunda bu oran 17.12'ye düşmüştür. Burhan vd., (2017) 6 farklı *L. fermentum* suşunun kolesterol asimilasyon yeteneğini belirlemişlerdir. Suşlar 100 mg/mL toplam kolesterol bulunan MRS besiyerine 10^{10} kob/mL olacak şekilde aşılınmış ve 24 saat anaerobik koşullarda inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda suşlar % 4.1 ve % 8.1 oranında asimilasyon göstermişlerdir. Castorena-Alba vd., (2017) çalışmasında farklı *Lactobasillus* ve *Bifidobacterium* suşlarının % 0.2 ve % 0.4 safra tuzu varlığındaki kolesterol asimilasyon yeteneklerini belirlemişlerdir. *B. lactis* DSM10140 suşu % 0.2 safra tuzu varlığında % 0.08 asimilasyon gösterirken % 0.4 safra tuzu varlığında bu yüzde % 18.69 olmuştur.

Alp ve Aslım (2010) çalışmasında anne sütü ile beslenen bebeklerin dışkılarından izole ettikleri 31 *Bifidobacterium* spp.'nin safra tuzlarına ve düşük pH'ya karşı direnç ile ekzopolisakkarit üretimlerini belirlemiş ve EPS üretimi ile safra tuzlarına karşı direnç ve düşük pH'ya karşı direnç arasında pozitif bir korelasyonlar bulmuşlardır ($p < 0.01$). EPS üreticisi suşları Bazı laktobasil suşlarının safra tuzlarının da yardımı ile kolesterolü asimile edebildiği birçok *in vitro* çalışma ile gösterilmiştir Horáčková vd., (2017). Tok ve Aslım (2010) çalışmalarında yüksek EPS üretimi olan suşların daha iyi bir kolesterol asimilasyonu sağladığını belirlemişlerdir. Ancak bizim çalışmamızda EPS üretimi ile kolesterol asimilasyonları arasında kuvvetli bir bağlantı bulunamamıştır. Yüksek miktarda EPS üretimi olan *L. plantarum* DA255 suşu % 41.19 oranında kolesterol asimilasyonu gösterirken *L. lactis* DA268 suşu EPS üreticisi olmamasına rağmen % 60.71'lik bir kolesterol asimilasyonu göstermiştir. Bu durum izolatların kolesterol asimilasyonunu EPS üretiminden farklı mekanizmalar ile sağladığı sonucunu düşündürmektedir. Çizelge 4.14'te İzolatların kolesterol asimilasyon yüzdeleri ve miktarları verilmiştir.

Çizelge 4.14. İzolatların kolesterol asimilasyon yüzdeleri ve miktarları

Mikroorganizma	Total Kolesterol Asimilasyonu (%)
<i>L. casei</i> DA4	16.91
<i>W. cibaria</i> DA8	32.15
<i>W. cibaria</i> DA28	36.31
<i>L. plantarum</i> DA100	34.14
<i>L. fermentum</i> DA134	33.51
<i>L. plantarum</i> DA135	30.50
<i>L. plantarum</i> DA140	43.27
<i>L. plantarum</i> DA199	42.18
<i>L. plantarum</i> DA218	50.63
<i>L. plantarum</i> DA225	55.50
<i>L. plantarum</i> DA245	16.71
<i>L. plantarum</i> DA255	41.19
<i>L. coryniformis</i> DA256	50.52
<i>L. coryniformis</i> DA263	36.22
<i>L. lactis</i> DA268	60.71

4.11. Otoagregasyon ve Koagregasyon Özellikleri

Agregasyon toplanma, bir araya gelme kümeleşme olarak tanımlanmaktadır. Laktik asit bakterilerinin agregasyon özelliği nedeniyle bulunduğu yüzeye ve birbirlerine yapışarak bir bariyer oluştururlar (Kımet, 1997). Laktik asit bakterileri koagregasyon özelliğinden dolayı bulunduğu ortama giren patojenlere agrege olarak onları etkisiz hale getirerek olası bir enfeksiyonu ve bakterinin toksik etkisini engellemiş olur (Eryılmaz, 2011). Tez kapsamında kullanılan mikroorganizmaların otoagregasyon özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan analiz sonucunda 5. saatin sonunda gerçekleşen otoagregasyon yüzdeleri % 94.16±1.1 ile % 13.11±0.3 arasında değişmiştir. *L. plantarum* DA100 izolatı 2. saatin sonunda % 72.85±1.2, 5. saatin sonunda ise % 74.6 ± 1.2, *L. coryniformis* DA263 ise 2. saatin sonunda % 92.00±0.5, 5. saatin sonunda ise 94.16±1.1 ile en iyi sonuçları vermişlerdir. Ayrıca *L. plantarum* DA245 suşu 2. saatin sonunda % 20.00±0 agregasyon gösterirken 5. saatin sonunda bu yüzde % 92.00±0 olmuştur. Çizelge 4.15’de Laktik asit bakterilerinin 2. ve 5. saat sonundaki otoagregasyon yüzdeleri verilmiştir.

Çizelge 4.15. Laktik Asit Bakterilerinin 2. ve 5. saat sonundaki otoagregasyon yüzdeleri

Mikroorganizma	2h. Otoagregasyon	5h. Otoagregasyon
<i>L. casei</i> DA4	52.65 ± 5.4	64.2 ± 0.0
<i>W. cibaria</i> DA8	50.00 ± 0.0	50.00 ± 0.0
<i>W. cibaria</i> DA28	59.25 ± 5.8	48.70 ± 1.8
<i>L. plantarum</i> DA100	72.85 ± 1.2	74.60 ± 1.2
<i>L. fermentum</i> DA134	26.23 ± 0.6	13.11 ± 0.3
<i>L. plantarum</i> DA135	33.33 ± 0.0	66.66 ± 0.0
<i>L. plantarum</i> DA140	75.00 ± 0.0	75.00 ± 0.0
<i>L. plantarum</i> DA199	36.83 ± 6.8	84.50 ± 0.7
<i>L. plantarum</i> DA218	42.62 ± 2.3	40.98 ± 0.0
<i>L. plantarum</i> DA225	25.00 ± 0.0	57.50 ± 0.0
<i>L. plantarum</i> DA245	20.00 ± 0.0	92.00 ± 0.0
<i>L. plantarum</i> DA255	22.50 ± 3.5	25.00 ± 0.0
<i>L. coryniformis</i> DA256	60.70 ± 0.0	65.20 ± 6.3
<i>L. coryniformis</i> DA263	92.00 ± 0.0	94.16 ± 1.1
<i>L. lactis</i> DA268	13.63 ± 6.4	22.72 ± 6.4

Probiyotik bakteriler, ağız boşluğunda bulunan mikroorganizmaların kolonizasyonunda etkili olan tutunma ve/veya koagregasyon faktörleri gibi farklı kolonizasyon mekanizmalarına sahiptir (Eryılmaz, 2011). Bağırsak ekosisteminin laktobasiller ile korunmasının iki ana mekanizma aracılığıyla olduğu düşünülmektedir. Bunlar; antimikrobiyal maddelerin üretimi ve patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu mukozada bir bariyer oluşturarak engellemeye yardımcı olan otoagregasyon ve koagregasyon yetenekleri şeklindedir. Koagregasyon ile ilgili yapılan çalışmalar ağırlıklı olarak insan ya da hayvanlardan izole edilmiş laktobasiller ile yapılmıştır. Gıda veya yemlerden izole edilmiş izolatların patojenlerle olan koagregasyon çalışmaları ile ilgili çok az çalışma bulunmaktadır (Aslım vd., 2007).

Tez kapsamında kullanılan mikroorganizmaların koagregasyon özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan analiz sonucunda 5. saatin sonunda *E. coli*'ye karşı gerçekleşen koagregasyon yüzdeleri % 97.56±0 ile % 13.20±0 arasında değişmiştir. En yüksek koagregasyon sonucunu *L. plantarum* DA199 suşu 2. saatin sonunda % 95.12±0. 5. saatin sonunda ise % 97.56±0 olarak vermiştir. Ardından *L. plantarum* DA135 suşu 5. Saatin sonunda % 95.12±0 ile en iyi koagregasyonu vermiştir. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis'e karşı ise sonucunu *L. plantarum* DA140 suşu 2. saatin sonunda % 77.41±0, 5. saatin sonunda ise % 83.87±0 olarak vermiştir.

L. plantarum DA199 suşu ise 2. saatin sonunda % 23.07±0 5. saatin sonunda ise % 48.71±0 vermiştir. En yüksek otoagregasyon sonuçlarından birinin elde edildiği *L. plantarum* DA100 suşu her iki patojen için ortalama % 60 koagregasyon göstermiştir. Aşağıda Çizelge 4.15’de Laktik asit bakterilerinin 2. ve 5. saat sonundaki *E. coli* ve *Salmonella enterica* serotype Enteritidis’e karşı koagregasyon yüzdeleri verilmiştir.

Çizelge 4.16. Laktik Asit Bakterilerinin 2. ve 5. saat sonundaki koagregasyon yüzdeleri

Mikroorganizmalar	2h. Koagregasyon	5h. Koagregasyon
<i>Escherichia coli</i>		
<i>L. casei</i> DA4	44.26 ± 4.6	49.17 ± 2.3
<i>W. cibaria</i> DA8	19.04 ± 0.0	33.33 ± 0.0
<i>W. cibaria</i> DA28	39.95 ± 5.0	33.30 ± 7.5
<i>L. plantarum</i> DA100	59.49 ± 3.5	59.49 ± 3.5
<i>L. fermentum</i> DA134	1.88 ± 0.0	13.20 ± 0.0
<i>L. plantarum</i> DA135	51.21 ± 0.0	95.12 ± 0.0
<i>L. plantarum</i> DA140	34.61 ± 1.8	53.72 ± 10.7
<i>L. plantarum</i> DA199	95.12 ± 0.0	97.56 ± 0.0
<i>L. plantarum</i> DA218	55.73 ± 2.4	52.44 ± 2.4
<i>L. plantarum</i> DA225	35.48 ± 0.0	51.61 ± 22.8
<i>L. plantarum</i> DA245	44.44 ± 0.0	87.49 ± 0.0
<i>L. plantarum</i> DA255	4.70 ± 3.70	16.66 ± 7.4
<i>L. coryniformis</i> DA256	38.18 ± 0.30	43.63 ± 0.0
<i>L. coryniformis</i> DA263	21.95 ± 0.0	51.21 ± 0.0
<i>Leuconostoc lactis</i> DA268	39.39 ± 0.0	45.45 ± 0.0
<i>Salmonella enterica</i> serotype Enteritidis		
<i>L. casei</i> DA4	49.11 ± 2.4	75.43 ± 0.0
<i>W. cibaria</i> DA8	73.68 ± 0.0	78.94 ± 0.0
<i>W. cibaria</i> DA28	32.14 ± 0.0	37.47 ± 3.3
<i>L. plantarum</i> DA100	57.3 ± 0.0	62.4 ± 2.3
<i>L. fermentum</i> DA134	10.22 ± 0.0	26.53 ± 0.0
<i>L. plantarum</i> DA135	48.71 ± 0.0	66.63 ± 0.0
<i>L. plantarum</i> DA140	77.41 ± 0.0	83.87 ± 0.0
<i>L. plantarum</i> DA199	23.07 ± 0.0	48.71 ± 0.0
<i>L. plantarum</i> DA218	42.07 ± 4.7	42.05 ± 0.0
<i>L. plantarum</i> DA225	75.86 ± 0.0	82.75 ± 0.0
<i>L. plantarum</i> DA245	59.72 ± 1.9	63.88 ± 0.0
<i>L. plantarum</i> DA255	18.41 ± 0.0	26.31 ± 2.5
<i>L. coryniformis</i> DA256	56.61 ± 4.6	45.0 ± 2.3
<i>L. coryniformis</i> DA263	52.56 ± 1.8	57.69 ± 1.8
<i>L. lactis</i> DA268	14.48 ± 0.0	15.17 ± 0.0

Bujnakova vd., (2003) çalışmasında tavuk feçeslerinden izole ettikleri 6 adet laktobasil ve 5 adet bifidobakterlerin otoagregasyon ve koagregasyon özelliklerini belirlemişlerdir. Laktobasil suşlarının 4 tanesi otoagregasyon özelliği göstermiştir. Bu suşlar içerisinde yüksek seviyede otoagregasyona sahip olanlar *E. coli* 57/4/1-

99'a karşıda iyi bir koagregasyon göstermişlerdir. Kang vd., (2005) çalışmasında *Weissella* ssp.'lerin koagregasyon ve tutunma yeteneklerini belirlemişlerdir. Çalışma sonunda *W. cibaria* suşu iyi bir tutunma ve koagregasyon göstermiş. LiCl ile muamele sonucunda yaklaşık 50 kDa molekül ağırlığına sahip s-katmanı proteini SDS-PAGE ile tespit edilmiştir. Aslım vd., (2007) çalışmalarında yoğurttan izole edilen 26 adet *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşunun agregasyon ve koagregasyon özelliklerini ile bağlantılı olabilecek özelliklerini belirlemişlerdir. Bu amaçla EPS üreten ve üretmeyen olmak üzere 4 suş seçilmiştir. EPS üreticisi suşlar yüksek bir otoagregasyon ve *E. coli* ATCC 11230'ye karşı iyi bir koagregasyon göstermiştir. Ekmekçi vd., (2009) çalışmasında vajinadan izole ettikleri 19 adet laktobasil suşunun *E. coli* ATCC 11229'ye karşı koagregasyon yeteneklerini belirlemişlerdir. Bütün suşlar pozitif sonuç vermiştir. En iyi sonucu aerobik koşullarda % 71 olarak anaerobik koşullarda ise % 62 olarak *L. acidophilus* S1 suşu vermiştir. Ayrıca suşların genel olarak düşük pH'da verdikleri koagregasyon yüzdeleri daha yüksek çıkmıştır. Eryılmaz. (2011) çalışmasında *P. acidilactici* OZV ve *L.brevis* OZV suşlarının otoagregasyon ve koagregasyon yeteneklerini incelemiştir. *P. acidilactici* OZV suşunun 5. saat sonundaki otoagregasyon yüzdesi % 79.49 iken *L. brevis* OZV suşunun yüzdesi % 78.13 bulunmuştur. Koagregasyon sonuçları ise *P. acidilactici* OZV suşunun 5. saatin sonunda *S. typhimirium* SL1344'a karşı % 4.35. *E.coli* LMG3083 (ETEC)'ye karşı ise % 11.82 bulunmuştur. *L. brevis* OZV suşunun 5.saatin sonundaki koagregasyonu *S. typhimirium* SL 1344'e karşı % 9.52, *E.coli* LMG3083 (ETEC)'ye karşı ise % 9.09 olarak hesaplanmıştır. Tuo vd., (2013) çalışmasında 22 adet laktobasil suşunun otoagregasyon ve koagregasyon yeteneklerini belirlemiş ve bunun bağırsaklarda tutunma yetenekleri ile bağlantısı olup olmadığını incelemişlerdir. Çalışma sonunda yüksek otoagregasyon yeteneğine sahip suşların iyi bir tutunma yeteneğine sahip olmadığı bu özelliğin suşdan suşa değiştiğini belirlemişlerdir. Li vd., (2015) geleneksel gıdalardan izole ettikleri 18 adet laktik asit bakterisinin otoagregasyon koagregasyon, hidrofobisite ve bağırsaklara tutunma yeteneklerini belirlemişlerdir. *E. faecalis* 5-5 suşu 22.80 ± 2.09 ile en yüksek otoagregasyon sağlarken *L. fermentum* 9sh suşu *Salmonella* ssp.'ye karşı 29.54 ± 2.37 ile en iyi koagregasyon yeteneğini göstermiştir. Ancak tutunma denemeleri sonunda en iyi sonucu otoagregasyon ve koagregasyon yeteneği daha düşük bulunan suşlar göstermiştir.

Birçok çalışma aggregasyon yeteneğinin hücre duvarına tutunma özelliği ile bağlantılı olduğunu göstermiştir. *Lactobasillus* suşları sahip oldukları S-katmanı proteini sayesinde bağırsak duvarına iyi tutunabilmektedirler. Laktobasillerde bulunan S-katmanı proteini glikolize olmayan proteinler içermekte ve 40-50 kD arası bir moleküler kütleyle sahiptir. Bu proteinler peptidoglukan yapı ile ilişkilidir ve LiCl ile muamele sonucu etkili ve seçici bir şekilde ekstrakte edilebilmektedir (Kang vd., 2005).

4.12. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Laktik asit bakterilerinin probiyotik özellik gösterebildikleri bilinmektedir. Bunu sahip oldukları bağırsak mukozasını aşırı oksidatiflere karşı koruma. patojen mikroorganizmalar ile besin ve bağırsaklarda tutunma yarışına girebilme kabiliyetleri ile özellikle bağırsakları istila eden patojeni hedefleyen güçlü antimikrobiyal peptitler (bakteriyosinler gibi) üretmeleri sayesinde yaptıkları bilinmektedir. Bu özellikleri sonucunda da bağırsaklarda kolonileşebildikleri düşünülmektedir. Probiyotik özellik gösteren mikroorganizmaların antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerde genel olarak katı ortam tercih edilir ve test kültürünün yaptığı etki. bir gösterge suşun gelişimini inhibe etmesinin saptanması şeklindedir (Coman vd., 2014).

Tez kapsamında kullanılan mikroorganizmaların antimikrobiyal aktivite özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan analiz sonucunda suşların tamamı test bakterileri üzerine genel inhibisyon etki göstermişlerdir. Elde edilen zonlar *E. coli*'ye karşı en yüksek 45 mm en düşük 20 mm olarak belirlenmiştir. Elde edilen zon çapları aşağıda çizelge 4.16'da verilmiştir.

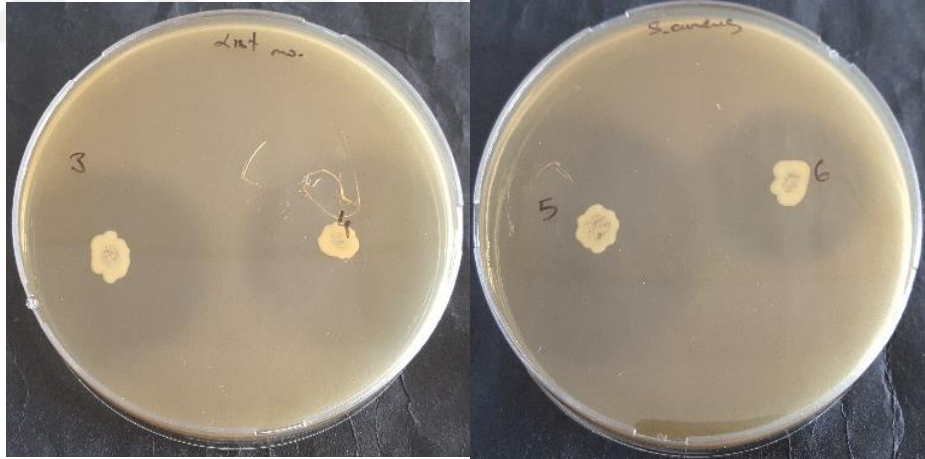
Çizelge 4.17. Antimikrobiyal analiz sonuçları (mm)

Kullanılan Laktik Asit Bakterileri	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
<i>L. casei</i> DA4	35	38	30	34
<i>W. cibaria</i> DA8	20	40	38	40
<i>W. cibaria</i> DA28	36	50	40	35
<i>L. plantarum</i> DA100	26	35	36	45
<i>L. fermentum</i> DA134	40	35	45	45
<i>L. plantarum</i> DA135	27	35	40	35
<i>L. plantarum</i> DA140	36	40	35	35
<i>L. plantarum</i> DA199	30	33	45	37
<i>L. plantarum</i> DA218	30	50	30	40
<i>L. plantarum</i> DA225	33	35	50	38
<i>L. plantarum</i> DA245	35	45	35	40
<i>L. plantarum</i> DA255	33	50	35	40
<i>L. coryniformis</i> DA256	35	55	35	40
<i>L. coryniformis</i> DA263	45	38	40	45
<i>L. lactis</i> DA268	33	45	40	45

Çon ve Gökalp (2000) çalışmalarında 51 farklı sucuk örneğinden izole ettikleri laktik asit bakterilerinin çeşitli patojenlere karşı antimikrobiyal etkilerini dökme plak ve kuyucuk testi ile belirlemişlerdir. İki yöntemin kıyaslanması sonucu dökme plak yöntemi ile daha çok mikroorganizma inhibisyon etki göstermiştir. Çadircı ve Citak (2010) çalışmasında 3 farklı laktobasil suşunun antimikrobiyal aktivitesini dökme plak ve kuyucuk yöntemi ile belirlemişlerdir. *L. helveticus* ve *L. plantarum* suşları ağırlıklı olarak daha iyi bir inhibisyon göstermiştir. *P. aeruginosa* ATCC 27853' e karşı tüm suşlar oldukça yüksek bir inhibisyon gösterirken *E. cloaceae* ATCC 13047 en dirençli patojen olmuştur. Çalışma sonunda dökme plak yönteminin mikroorganizmanın tüm metabolitlerini aynı anda kapsadığı için daha hassas bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır. Venkadesan vd., (2015) çalışmasında çeşitli fermente gıdalardan izole ettiği 9 adet laktik asit bakterisinin *E. coli*, *S. typhi*, *Shigella*, *S. aureus* ve *L. monocytogenes*'e karşı antibakteriyel aktivitelerini ve bakteriyosin üretimlerini belirlemiştir. İzolatların tamamı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. En iyi sonucu *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* vermiştir. Tebyanian vd., (2017) çalışmasında 4 farklı laktobasil suşunun (*L. bulgaricus* (PTCC 1332), *L. casei* (PTCC 1608), *L. plantarum* (PTCC 1058) ve *L. fermentum* (PTCC 1638)) 4 adet enterik patojene karşı (*E. coli*, *S. aureus*, *S. dysenteriae* ve *S. paratyphi* A) antimikrobiyal etkinlik gösterip göstermediğini incelemişlerdir. İnhibisyon zonları 12 mm ile 32 mm arasında değişmiş ve suşların tamamı inhibisyon göstermiştir. Oldak vd., (2017) çalışmasında çeşitli geleneksel peynirlerden elde ettikleri 29 farklı

L. plantarum suşunun *L. monocytogenes* ATCC 15313, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. monocytogenes* ATCC 19111, *E. coli* ATCC 10536, *B. subtilis*, *E. faecium* ve *S. enteritidis* ATCC 13076'e karşı antimikrobiyal etkisini incelemişlerdir. İzolatların tamamı inhibisyon göstermiş ancak suşlar arasında farklılıklar gözlemlenmiştir. En yüksek zon çapı *L. plantarum* Os13 ve Kor14 tarafından *L. monocytogenes* ATCC 19111'e karşı göstermişlerdir.

Elde edilen sonuçlar, yapılan çalışmalar ile paralellik göstermektedir. Tebyanian vd., (2017) laktobasil suşları ile yaptığı çalışmada inhibisyon zonlarını 12 mm ile 32 mm arasında bulmuştur. Bizim çalışmamız paralellik göstermekle beraber daha yüksek zon çapları ağırlıklıdır. Ancak bu sonuçlar Çon ve Gökalp (2000) ve Çadırcı ve Citak (2010) çalışmalarında olduğu gibi dökme plak yönteminde elde edilmiş olup, kuyu yönteminde herhangi bir zon elde edilememiştir. Bu durum nedeni olarak dökme plak yönteminin metabolitlerin tamamını içermesinden kaynaklandığını düşünülmektedir. Şekil 4.10'da suşların test bakterileri üzerine genel inhibisyon etkileri verilmiştir.



Şekil 4.10. Suşların test bakterileri üzerine genel inhibisyon etkileri

4.13. Sindirim Sistemi Modellemesi

Gıda maddelerinin mideden geçişi gıdanın bileşim ve niteliklerine bağlı olarak genellikle 1-4 saatte tamamlanmaktadır. Farklı yönlerde üç kas tabakası taşıyan midenin peristaltik hareketleri ve salgıları yardımıyla midede kalan maddeler kimüs haline gelmektedir. Kimüs. ufak parçalar halinde midenin peristaltik hareketleriyle ince bağırsağın ilk 20-25 cm'lik bölümü olan duodenuma (onikiparmak bağırsağı) geçmektedir (Göçer ve Küçükçetin 2016). Midenin boşalma hızı, gıdanın fiziksel ve kimyasal bileşimine bağlı olarak değişmektedir. Sıvılar katılara göre, karbonhidratlar proteinlere göre, proteinler de yağlara göre mideyi daha hızlı terk etmektedir (Rogers, 2011; Göçer ve Küçükçetin 2016). Hem sindirimin hem de emilimin gerçekleştiği ince bağırsaklar, sindirim sisteminin en uzun ve en önemli bölümüdür. Bağırsak iç yüzeyinde bulunan villuslarda emilim gerçekleşmekte ve bu sayede ince bağırsağın emme yüzeyi 550 m²'ye kadar ulaşmaktadır. Yapısında bağırsak duvarlarının sindirilip zarara uğramasını önleyen ve sindirimi tamamlayan enzimler bulunan ince bağırsak salgısı. Yetişkin bir insanda günde ortalama 2-3 litre kadar salgılanmaktadır. İnce bağırsak salgısının pH'sı 7.8-8.0 civarında olup, gıdalar; ince bağırsak kaslarının peristaltik hareketleri yardımıyla ağır fakat düzenli olarak anal yönde ilerlerken, bir yandan da enzimlerle karşılaşmaktadır. Gıdaların sindirilmesi ile oluşan posa maddelerinin kalın bağırsağa ulaşması için geçen süre ortalama 8 saattir (Göçer ve Küçükçetin 2016).

Tez kapsamında yapılan sindirim sistemi modellemesinde *L. casei* DA4, *W. cibaria* DA28, *L. plantarum* DA100, *L. plantarum* DA140, *L. coryniformis* DA263 suşları ile *L. monocytogenes*, *E. coli* ve *S. enteritidis*'in dayanımları tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.18'de verilmiştir.

Çizelge 4.18. LAB'nin ve patojen bakterilerinin sindirim sistemi modellemesi dayanımları

Mikroorganizmalar	0h. pH 3.0	3h.pH 3.0	Canlılık % 0-3h.	4h. pH 8	Canlılık % 0-4h.
<i>L. casei</i> DA4	8.23	7.92	96.23	7.77	94.41
<i>W. cibaria</i> DA28	8.30	7.95	95.78	7.61	91.68
<i>L. plantarum</i> DA100	8.20	7.94	96.82	7.95	96.95
<i>L. plantarum</i> DA140	8.23	7.90	95.99	7.83	95.13
<i>L.coryniformis</i> DA263	7.84	7.81	99.61	7.17	91.45
<i>L. monocytogenes</i>	7.81	7.86	100.62	7.88	100.89
<i>E. coli</i>	7.98	8.17	102.38	7.81	97.86
<i>S. enteritidis</i>	8.00	8.00	100.00	8.55	106.87

Modellemede kullanılan laktik asit bakterilerinin tamamı 7. saat sonunda canlılıklarını korumuşlardır. Canlılık yüzdeleri patojen mikroorganizmalar ile kıyaslandığında yakın değerler bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar bu suşların patojen mikroorganizmalar kadar sindirim sistemi ortamına dayanım gösterebileceğini düşünmemizi sağlamıştır. Modelleme denemesi sonuçları daha önce yapılan pH 3 'de 3mg/mL pepsin. pH 8'de 1mg/mL pankreatin ve % 1 safra tuzu dirençlilik testleri sonuçları kıyaslandığında *L. casei* DA4, *W. cibaria* DA28, *L. plantarum* DA100'de canlılık yüzdelerinde önemli bir değişiklik olmazken, *L. plantarum* DA140'da ayrı ayrı yapılan test sonuçlarına kıyasla ortalama % 5'lik bir düşüş gözlemlenmiştir. *L. coryniformis* DA263 suşu ise pH 3.0'te 3 mg/mL pepsin denemesinde 3. saat sonunda canlılık gösteremezken modelleme denemesinde bu süreyi % 99 canlılık oranı ile tamamlamış pankreatin+safra tuzu kısmını ise % 91 canlılıkla tamamlamıştır.

Sumeri vd., (2008) çalışmalarında gastrointestinal sistemin üst bölümünden gıda geçişini simüle eden bir biyoreaktör model geliştirmişlerdir. Model; gıdaların probiyotik potansiyellerini ölçmeye imkan sağlamakta. kontrol ünitesi ve kontrol ünitesine bağlı fermentör ve teraziden oluşmaktadır. pH, sıcaklık sensörleri ile HCl, NaHCO₃, safra asidi ve sıvı besiyeri ortamında geliştirilmiş mikroorganizmaların akışını kontrol eden çeşitli sabit hız pompaları ile donatılmıştır. Ayrıca iç sıcaklığı 37.0±0.1°C'de tutulmakta olan biyoreaktöre anaerobik koşulların sağlanması amacıyla azot gazı verilmiştir. Denemede *L. acidophilus* La-5, *L. johnsonii* NCC 533, *L. casei* ve *L. rhamnosus* GG suşları kullanılmış analiz sonunda *L. acidophilus*

ve *L. Johnsonii* laktokoklara ve diğerk laktobasil suşlarına göre daha iyi sonuçlar vermiştir.

Kong ve Singh (2010) mide duvarının sürekli peristaltik hareketini üretebilmek amacıyla insan mide simülatörünü geliştirmişlerdir. Gerçek peristaltik dalgalar elde edebilmek için gıdalar üzerine etki eden mekanik kuvvetler üretilmiş ayrıca midede dinamik sindirim prosesini simüle etmek için mide salgılarını, boşaltım sistemlerini ve sıcaklık kontrol sistemini de modele dahil etmişlerdir. Elde edilen sonuçlar ışığında modelin *in vivo* çalışmalar alternatif olarak iyi bir performans sergilediği belirlenmiştir.

4.14. İzolatların Bağırsak Hücrelerine Tutunma ve Patojenlerin Tutunmalarını Engelleme Yeteneklerinin Belirlenmesi

Tez kapsamında farklı kaynaklardan izole edilmiş ve tanımlamaları yapılmış 5 adet laktik asit bakterisinin (*L. casei* DA4, *W. cibaria* DA28, *L. plantarum* DA100, *L. plantarum* DA140, *L. coryniformis* DA263) ve bağırsak hücrelerine tutunma ve patojenlerin (*L. monocytogenes*, *E. coli* Tip I, *S. enteritidis*, *E. coli* O157:H7 ve *C. difficile*) tutunmalarını engelleme yetenekleri belirlenmiştir.

L. casei DA4, *W. cibaria* DA28, *L. plantarum* DA100, *L. plantarum* DA140, *L. coryniformis* DA263 izolatları daha önce tez kapsamında yapılan analiz sonuçları ve izolasyon kaynakları göz önünde bulundurularak denemede kullanılmak üzere seçilmiştir. 1 ve 3 saatlik inkübasyon süreleri tutunma denemesi için yeterli olup olmadığının belirlenmesi amacıyla ön deneme yapılmıştır. Yapılan ön deneme sonucunda 1 saatlik inkübasyon ile 3 saatlik inkübasyonun tutunan bakteri sayısı arasında fark oluşturmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle deneme 1 saatlik inkübasyon süresi uygulanarak yapılmıştır.

Tutunma denemesi için seçilen laktik asit bakterilerinin ilk aşamada tek tek bağırsaklara tutunma yetenekleri belirlenmiştir. Çizelge 4.19'da tutunma denemesi sonucu laktik asit bakterilerinin başlangıç ve 1. saat sonundaki log-kob/mL sonuçları ve % tutunma sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.19. Laktik Asit Bakterilerinin bağırsak modelinde tutunma denemesi sonuçları

Mikroorganizma	0 h.	1 h.	Tutunma%
<i>Lactobacillus casei</i> DA4	8.47	6.47	76.38
<i>Weissella cibaria</i> DA28	8.47	7.17	84.65
<i>Lactobacillus plantarum</i> DA100	8.47	6.69	78.98
<i>Lactobacillus plantarum</i> DA140	8.47	6.77	79.92
<i>Lactobacillus coryniformis</i> DA263	8.47	6.47	76.38

Selwood vd., (1975) sağlıklı domuzlardan kesim sonrası alınmış taze bağırsak örnekleri ile çalışmıştır. Çalışmada farklı sıcaklık ve sürelerde çeşitli bakteri cinslerinin tutunma oranları denenmiştir. Alınan bağırsak gerekli temizlik işlemlerinin ardından 1cmx2cm'lik parçalara bölünmüş ve 1×10^9 kob/mL *E. coli* K88 içeren 100µL, PBS eklenmiştir. En iyi sonuçlar 37°C'de 60 dakika inkübasyon ile elde edilmiştir. Eden vd., (1977) kalın bağırsak hücrelerinde *E. coli*'nin tutunma yeteneğini belirlemişlerdir. Denemede farklı sürelerin (10, 30, 60, 90, 120, 180 ve 240 dakika) ve farklı bakteri yoğunluklarının (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 kob/mL) etkisini incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlar ideal tutunma süresinin 60 dakika yoğunluğun ise 10^7 ve 10^8 kob/mL'in altında yetersiz kaldığını göstermiştir. Vesterlund vd., (2005) laktik asit bakterileri ile *S. aureus*'un bağırsak epitel hücrelerine tutunma sırasındaki etkileşimini incelemişlerdir. Bu amaçla kolon kanseri hastalarından sağlıklı kolon bağırsak hücreleri (9mm) alınmıştır. Hücreler % 40 gliserol içeren PBS'de -86°C'de muhafaza edilmiş. analiz öncesi 10 mM HEPES ile yıkama yapılmıştır. İki tip deneme uygulanmıştır. İlki 50µl $2.5-5 \times 10^7$ kob/mL laktik asit bakterisi içeren PBS eklenerek 1 saat inkübe edilmiş. ardından HEPES ile yıkama yapılarak tutunmayan bakteriler uzaklaştırılmıştır. Bu işlemin ardından 50 µl 1×10^8 kob/mL yoğunlukta radyoaktif işaretleme yapılmış *S. aureus* içeren PBS eklenerek tekrar 37°C'de 1saat inkübe edilmiştir. İkinci denemede ise bu mikroorganizmalar ilk deneme ile aynı miktar ve yoğunlukta olacak şekilde ayarlanarak bağırsak hücrelerine eş zamanlı olarak verilmiş ardından 37°C'de 1saat inkübe edilmiştir. Çalışma sonunda laktik asit bakterileri her iki denemede de yüksek tutunma yüzdeleri göstermiş olmalarına karşın *S. aureus*'un tutunmasını engellemede etkin olamamışlardır. Bu durumun *S. aureus*'un daha iyi tutunma yeteneğine sahip olmasından kaynaklandığını düşünmüşlerdir. Kucan vd., (2012) çalışmalarında *in vitro* ve *in vivo* ortamda olmak üzere *L. plantarum* S1 suşunun bağırsaklara tutunma

yeteneğini belirlemişlerdir. Sağlıklı farelerden alınan bağırsak hücreleri gerekli yıkama işlemlerinin ardından 10^8 kob/mL yoğunlukta *L. plantarum* S1 içerecek şekilde hazırlanmış PBS eklenerek 37°C 'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Ardından Brown ve Brenn boyama uygulanmıştır. Bu boyama sonucunda Gram (+) bakteriler mavi, Gram (-)'ler kırmızı-pembe, doku hücrelerinin çekirdeği kırmızı, diğer doku elemanları ise sarı renkli olarak belirlenmiştir. *In vivo* modelde ise fareler 5 gün boyunca 1×10^{11} kob/mL bakteri içeren 100 μL steril 0.8 % NaCl süspansiyonu verilmiştir. *In vivo* denemede ilk beslemeden 2 saat sonrasında alınan gaita örneklerinden yapılan sayım sonucu *L. plantarum* S1 sayısında yaklaşık 1 logaritmalık düşüş olurken, gün sonunda bu sayı yaklaşık 3 logaritma olarak belirlenmiştir.

Tez kapsamında yapılan tutunma denemesi sonunda laktik asit bakterileri % 76.38 ile % 84.65 arasında tutunma göstermişlerdir. Sonuçlarımız Kucan vd., (2012), Rajoka vd., (2018) ve Lau ve Chye (2018) çalışmaları ile paralellik göstermiştir. *W. cibaria* DA28 izolatu bağırsak hücrelerine % 84.65 ile tutunmuştur. Bu sonuç Le vd., (2018) çalışmasında elde edilen tutunma yüzdelerinden daha yüksektir. Deneme başlangıcında laktik asit bakteri sayıları 8.47 logaritma iken 1 saatlik inkübasyon sonunda ortalama 2.0 logaritmalık azalma meydana gelmiştir. Bu sonuçlar Kucan vd., (2012) çalışması ile paralellik göstermiştir.

Sidira vd., (2015) çalışmasında buğday tanesinden izole edilen probiyotik *L. casei* ATCC 393 ve *L. plantarum* NCIMB 8826 suşlarını taze ve liyofilize formlarını immobilize etmiş ve Caco-2 hücrelerine tutunma özellikleri arasında farklılık olup olmadığını incelemişlerdir. Taze kültürlerin Caco-2 hücrelerine daha iyi tutunabildikleri belirlenmiştir. Bunun immobilize kültürlerin direk Caco-2 hücrelerine erişememesinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Rajoka vd., (2018) çalışmasında kümes hayvanlarının bağırsaklarından izole edip tanımladıkları 13 adet laktobasil suşunun probiyotik olma özellikleri ve Caco-2 hücrelerine tutunma yeteneklerini test etmişlerdir. İzolatların Caco-2 hücrelerine tutunma yetenekleri % 76 ile % 85 arasında değişmiştir. Dowarah vd., (2018) domuz gaitasından izole ettikleri laktik asit bakterilerinin probiyotik olma özelliklerini belirlemişlerdir. Bağırsaklara tutunma yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla domuz ve tavuk bağırsakları alınmış PBS ile yıkanmış ardından 1cm^2 'ye 10^9 kob/mL düşecek şekilde

mikroorganizma eklenmiş ve 37°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. Çalışma sonunda düşük pH, safra tuzu sindirim enzimleri gibi çeşitli sindirim sistemi denemelerinde ve tutunma denemesinde en iyi sonucu *P. acidilactici* FT28 suşu vermiştir. Bağırsak tutunması denemesi sonucunda ise çalışmada kullanılan izolatlar içersinde sadece bu suş, domuz bağırsağında tutunabilmiştir. Choudhary vd., (2018) laktasyon dönemindeki kısıraklardan izole ettiği *L. pentosus* MMP4 suşu ile yaptığı çalışmada *in vitro* ortamda sindirim sistemi denemelerine tabi tutmuş ardından 4-5 haftalık 15-20 gram ağırlığında albino farelerde tutunma denemesi yapmıştır. Suş, farelerin içme suyuna 7 gün süre ile 10^6 – 10^7 kob/mL olacak şekilde eklenmiştir. Deneme sonunda elektron mikroskobu ile görüntüleme yapılarak *L. pentosus* MMP4 suşunun bağırsaklardaki varlığı belirlenmiştir.

Bubnov vd., (2018) çalışmasında *Lactobacillus acidophilus* IMV B-7279, *L. casei* IMV B-7280, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IMV B-7281, *L. rhamnosus* LB-3 VK6, *L. delbrueckii* LE VK8, *L. plantarum* LM VK7 ve *Bifidobacterium animalis* VKL, *B. animalis* VKB suşları ile çalışmış, bu mikroorganizmaların ortalama yapışma oranı, epitel hücrelerinin katılım oranı ile mikroorganizmaların yapışkanlık indeksini incelemiştir. Caco-2 hücreleri ile yapılan deneme sonunda *L. casei* IMV B-7280, *B. animalis* VKL ve *B. animalis* VKB; suşlarının yapışma indeksi oldukça yüksek bulunurken *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IMV B-7281 orta, ve *L. acidophilus* IMV B-7279, *L. rhamnosus* LB-3 VK6, *L. delbrueckii* LE VK8 ve *L. plantarum* LM VK7’ ise düşük bulunmuştur. Le vd., (2018) deniz ürünlerinden izole ettikleri *W. cibaria* FB-069 ve *W. viridescens* FB-077 suşlarının probiyotik olma özelliklerini ve Caco-2 hücreleri ile tutunma yeteneklerini belirlemişlerdir. Yapılan *in vitro* sindirim sistemi denemelerinde her iki suş da oldukça yüksek canlılık oranları gösterirken Caco-2 hücrelerine tutunma yüzdeleri *W. cibaria* FB-069’un % 25, *W. viridescens* FB-077’nin ise % 23 olarak belirlenmiştir. Lau ve Chye (2018) *Lactobacillus plantarum* 0612 suşunun *E. coli*, *Salmonella enteritidis* ve *L. monocytogenes*’e karşı Caco-2 hücreleri kullanarak etkileşimlerini incelemişlerdir. Ayrıca *L. plantarum* 0612 suşunu 5M Lithium Chloride (LiCl) ile muamele ederek yüzey proteinlerinin tutunmaya etkisini de incelemişlerdir. Yüzey proteini uzaklaştırılmadan yapılan denemede *L. plantarum* 0612 başlangıç yoğunluğu 8.00 logaritma iken deneme sonunda 7.42 log-kob/mL olarak belirlenmiş, LiCl ile muamele sonrası aynı suş denemeyi 3.21 logaritma yoğunlukta tamamlamıştır. *E.*

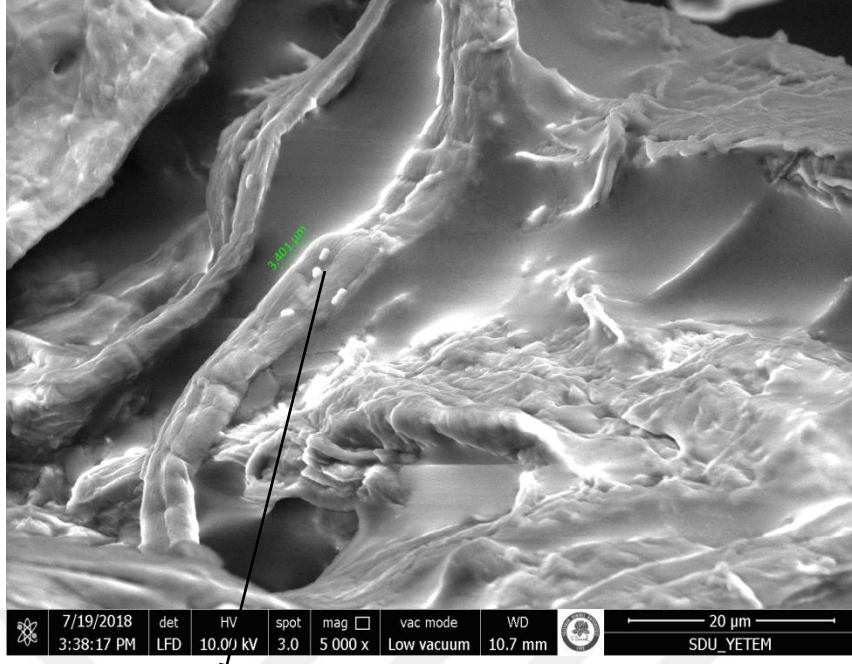
coli'ye karşı rekabet sonucunda *E. coli* 7.0 logaritmadan 3.56'ya düşerken, *S. enteritidis* 3 logaratitmalık, *L. monocytogenes* ise 3.80 log-kob/mL seviyesine düşmüştür.

E. coli Tip I'e karşı laktik asit bakterilerinden en iyi tutunma özelliğini % 87.32 ile *L. plantarum* DA100 suşuda tespit edilmiştir. *E. coli* OH157:H7 için bu rakam % 92.50 ile yine *L. plantarum* DA100 suşuna aittir. Şekil 4.14'de *L. plantarum* DA100 suşunun tutunma yüzdeleri verilmiştir. Çizelge 4.20'de ise patojen mikroorganizmalara karşı tutunma denemesi sonucu laktik asit bakterilerinin başlangıç ve 1. saat sonundaki % tutunma ve log-kob/mL sonuçları verilmiştir.

S. Enteritidis'e karşı yapılan tutunma denemesi sonucunda ise en yüksek tutunmayı *L. plantarum* DA140 suşu % 87.65 olarak göstermiştir. Şekil 4.15'de *L. plantarum* DA140 suşunun tutunma yüzdeleri verilmiştir. *L. casei* DA4 suşu *L. monocytogenes*'e karşı % 91.51 tutunma yüzdesi ile bu patojene karşı en iyi sonucu göstermiştir. Şekil 4.12'de *L. casei* DA4 suşunun tutunma yüzdeleri verilmiştir.

C. difficile'ye karşı yapılan denemede laktik asit bakterileri ortalama % 84.14 tutunma göstermişlerdir. Şekil 4.13'de *W. cibaria* DA28 suşunun tutunma yüzdeleri, Şekil 4.16'da *L. coryniformis* DA263 suşunun tutunma yüzdeleri verilmiştir.

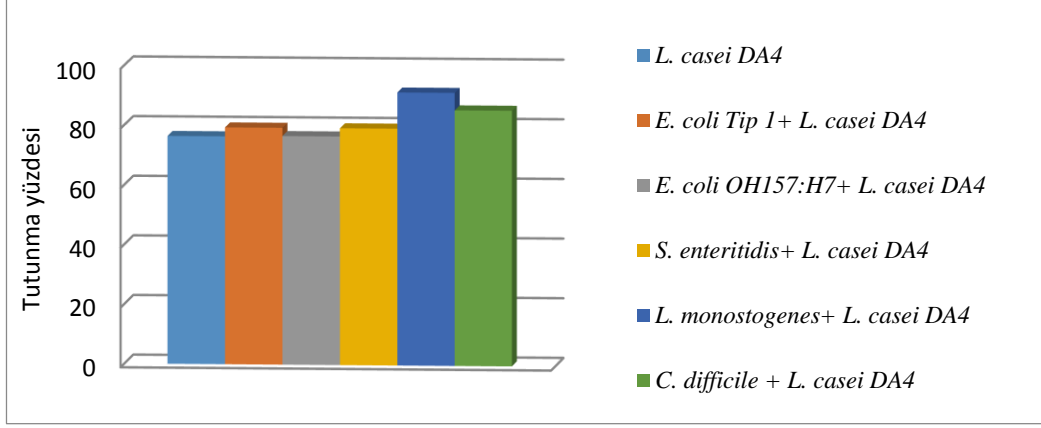
Çalışma sonunda laktik asit bakterileri bağırsak hücrelerine hem tek hem de patojen mikroorganizmalar varlığında yapılan denemelerde yüksek tutunma yüzdeleri vermişlerdir. Şekil 4.11'de *L. plantarum* DA140 suşunun bağırsak hücrelerine tutunma taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüsü verilmiştir.



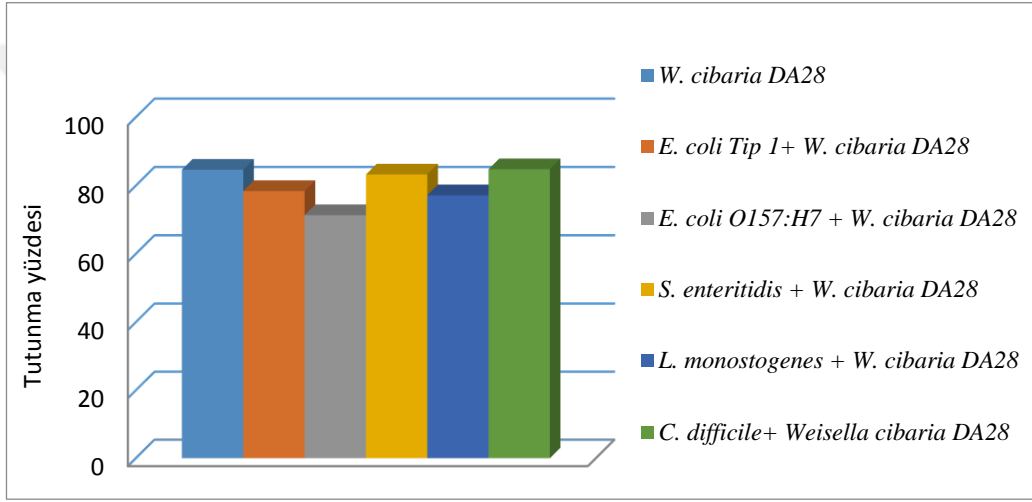
Şekil 4.11. *Lactobacillus plantarum* DA140 suşunun bağırsak hücrelerine tutunma taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüsü

Çizelge 4. 20. Patojen mikroorganizmalara karşı tutunma denemesi sonucu laktik asit bakterilerinin başlangıç ve 1. saat sonundaki % tutunma sonuçları

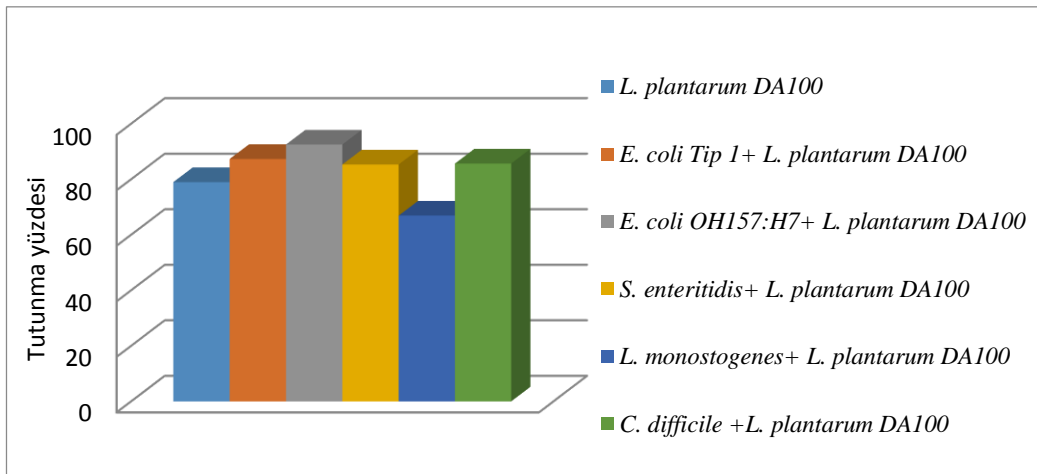
Mikroorganizma	0h.	1.h	Tutunma %
<i>E. coli</i> Tip 1+ <i>L. casei</i> DA4	9.07	7.20	79.38
<i>E. coli</i> OH157:H7+ <i>L. casei</i> DA4	9.07	6.95	76.62
<i>S. enteritidis</i> + <i>L. casei</i> DA4	9.07	7.20	79.38
<i>L. monocytogenes</i> + <i>L. casei</i> DA4	9.07	8.30	91.51
<i>C. difficile</i> + <i>L. casei</i> DA4	9.07	7.77	85.67
<i>E. coli</i> Tip 1+ <i>W. cibaria</i> DA28	9.07	7.11	78.39
<i>E. coli</i> OH157:H7+ <i>W. cibaria</i> DA28	9.07	6.47	71.33
<i>S. enteritidis</i> + <i>W. cibaria</i> DA28	9.07	7.55	83.24
<i>L. monocytogenes</i> + <i>W. cibaria</i> DA28	9.07	7.00	77.17
<i>C. difficile</i> + <i>W. cibaria</i> DA28	9.07	7.69	84.79
<i>E. coli</i> Tip 1+ <i>L. plantarum</i> DA100	9.07	7.92	87.32
<i>E. coli</i> OH157:H7+ <i>L. plantarum</i> DA100	9.07	8.39	92.50
<i>S. enteritidis</i> + <i>L. plantarum</i> DA100	9.07	7.74	85.33
<i>L. monocytogenes</i> + <i>L. plantarum</i> DA100	9.07	6.07	66.92
<i>C. difficile</i> + <i>L. plantarum</i> DA100	9.07	7.77	85.67
<i>E. coli</i> Tip 1+ <i>L. plantarum</i> DA140	9.07	7.55	83.24
<i>E. coli</i> OH157:H7+ <i>L. plantarum</i> DA140	9.07	7.65	84.34
<i>S. enteritidis</i> + <i>L. plantarum</i> DA140	9.07	7.95	87.65
<i>L. monocytogenes</i> + <i>L. plantarum</i> DA140	9.07	7.74	85.33
<i>C. difficile</i> + <i>L. plantarum</i> DA140	9.07	7.63	84.12
<i>E. coli</i> Tip 1+ <i>L. coryniformis</i> DA263	9.07	7.32	80.70
<i>E. coli</i> OH157:H7+ <i>L. coryniformis</i> DA263	9.07	7.04	77.61
<i>S. enteritidis</i> + <i>L. coryniformis</i> DA263	9.07	6.84	75.41
<i>L. monocytogenes</i> + <i>L. coryniformis</i> DA263	9.07	7.44	82.02
<i>C. difficile</i> + <i>L. coryniformis</i> DA263	9.07	7.30	80.49



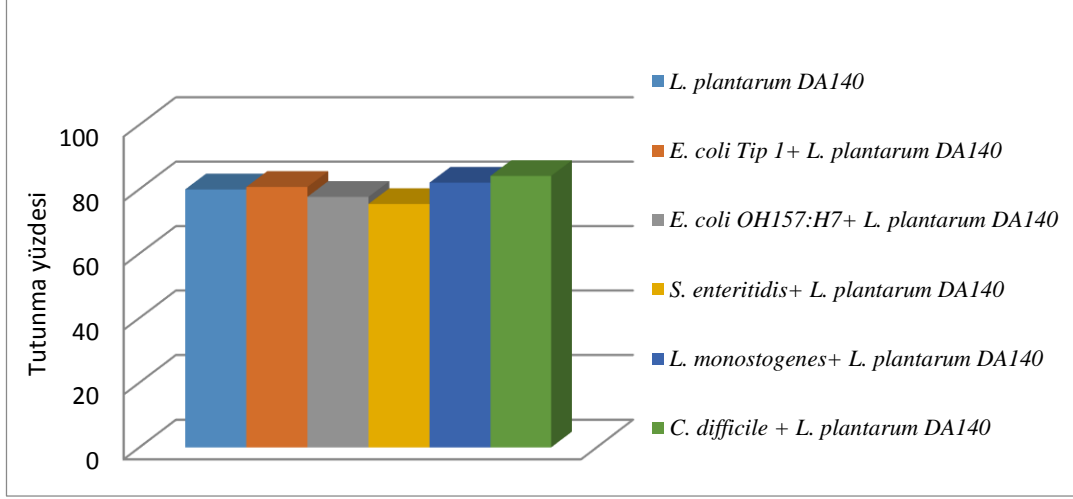
Şekil 4.12. *Lactobacillus casei* DA4 Suşunun Tutunma Yüzdeleri



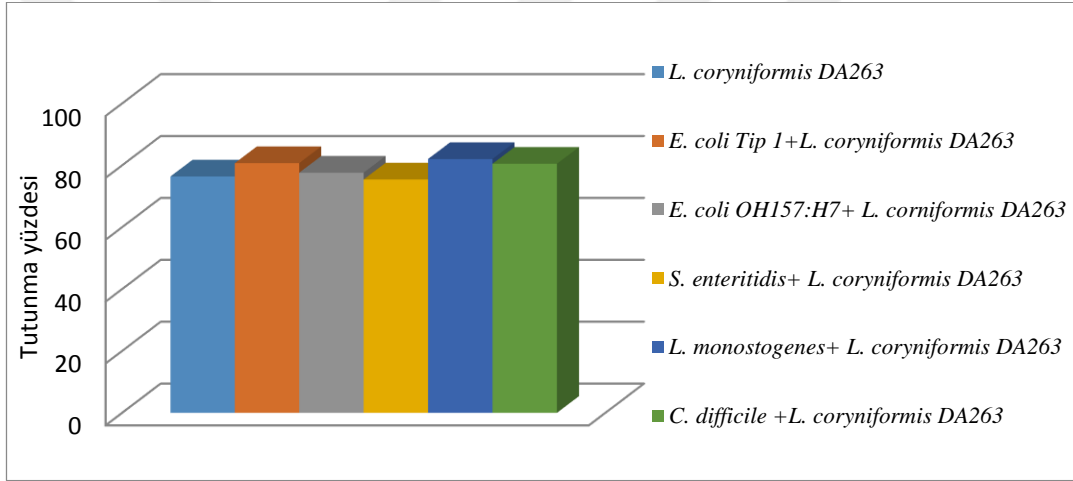
Şekil 4.13. *Weisella cibaria* DA28 Suşunun Tutunma Yüzdesi



Şekil 4.14. *Lactobacillus plantarum* DA100 Suşunun Tutunma Yüzdesi



Şekil 4.15. *Lactobacillus plantarum* DA140 Suşunun Tutunma Yüzdesi



Şekil 4.16. *Lactobacillus coryniformis* DA263 Suşunun Tutunma Yüzdesi

Laktik asit bakterilerinin patojen mikroorganizmaların bağırsak hücrelerine tutunmalarını engelleme yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan denemede elde edilen patojen mikroorganizmaların başlangıç ve 1. saat sonundaki log-kob/mL sonuçları ve % tutunma sonuçları Çizelge 4. 20'de verilmiştir. Denemeye patojen mikroorganizmalar 1.5×10^6 kob/mL düzeyinde başlatılmıştır. 1 saatlik inkübasyonun sonunda en düşük tutunma yüzdeleri *L. monocytogenes* ve *C. difficile*'de görülmüştür. Bu mikroorganizmalarda tutunma denemesi sonunda ortalama 3 logaritmik düşüş hesaplanmıştır. *E. coli* Tip I. ve *E. coli* O157:H7, *Salmonella enterica* serotype Enteritidis'de ise ortalama 1 logaritmik düşüş hesaplanmıştır.

Çizelge 4.21. Laktik Asit Bakterilerinin patojenlerin tutunmasını engelleme denemesi sonuçları

Mikroorganizma	0h.	1h.	Tutunma %
<i>E. coli</i> Tip 1+ <i>L. casei</i> DA4	6.17	4.95	80.23
<i>E. coli</i> OH157:H7+ <i>L. casei</i> DA4	6.17	5.60	90.76
<i>S. enteritidis</i> + <i>L. casei</i> DA4	6.17	4.84	78.44
<i>L. monocytogenes</i> + <i>L. casei</i> DA4	6.17	3.00	48.62
<i>C. difficile</i> + <i>L. casei</i> DA4	6.17	3.47	56.24
<i>E. coli</i> Tip 1+ <i>W. cibaria</i> DA28	6.17	6.04	97.89
<i>E. coli</i> OH157:H7+ <i>W. cibaria</i> DA28	6.17	5.47	88.65
<i>S. enteritidis</i> + <i>W. cibaria</i> DA28	6.17	4.95	80.23
<i>L. monocytogenes</i> + <i>W. cibaria</i> DA28	6.17	3.47	56.24
<i>C. difficile</i> + <i>W. cibaria</i> DA28	6.17	3.00	48.62
<i>E. coli</i> Tip 1+ <i>L. plantarum</i> DA100	6.17	4.95	80.23
<i>E. coli</i> OH157:H7+ <i>L. plantarum</i> DA100	6.17	5.95	96.43
<i>S. enteritidis</i> + <i>L. plantarum</i> DA100	6.17	4.84	78.44
<i>L. monocytogenes</i> + <i>L. plantarum</i> DA100	6.17	3.30	53.48
<i>C. difficile</i> + <i>L. plantarum</i> DA100	6.17	3.00	48.62
<i>E. coli</i> Tip 1+ <i>L. plantarum</i> DA140	6.17	6.04	97.89
<i>E. coli</i> OH157:H7+ <i>L. plantarum</i> DA140	6.17	5.30	85.90
<i>S. enteritidis</i> + <i>L. plantarum</i> DA140	6.17	4.69	76.01
<i>L. monocytogenes</i> + <i>L. plantarum</i> DA140	6.17	3.00	48.62
<i>C. difficile</i> + <i>L. plantarum</i> DA140	6.17	3.47	56.24
<i>E. coli</i> Tip 1+ <i>L. coryniformis</i> DA263	6.17	6.00	97.24
<i>E. coli</i> OH157:H7+ <i>L. coryniformis</i> DA263	6.17	5.95	96.43
<i>S. enteritidis</i> + <i>L. coryniformis</i> DA263	6.17	4.90	79.42
<i>L. monocytogenes</i> + <i>L. coryniformis</i> DA263	6.17	4.00	64.83
<i>C. difficile</i> + <i>L. coryniformis</i> DA263	6.17	3.00	48.62

Denemede laktik asit bakterileri ile patojen mikroorganizmalar bağırsak hücrelerine eş zamanlı olarak verilmiştir. Bu sayede aynı anda bağırsak hücrelerine ulaşan bu iki grup mikroorganizmanın villuslara tutunma yetenekleri ile birbirleri arasındaki etkileşimleri sonucu laktik asit bakterilerinin patojenlerin tutunma yüzdelerine olan etkisi incelenmiştir.

E. coli, *Escherichia* ailesi içinde en önemli tür olmakla beraber insan ve hayvanlar için önemli fırsatçı patojendir. *E. coli*, suşları kalın bağırsak florası içinde en yaygın fakültatif anaerob türdür. Bağırsakların normal flora üyesi olan *E. coli* bağırsaklarda diğer patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu önlemede rol oynadığı düşünülmektedir. Bağırsaklarda ishal oluşturan suşları dışında kommensal olarak yaşarlar. *Salmonella*'lar sağlıklı kişiler tarafından kirli su ve yiyeceklerle alınarak mideye gelirler. Mide asidine duyarlıdırlar ancak bol besin maddesi ve içeceklerle alındıklarında mide asidinden etkilenmeden mideyi geçebilirler. Ağızdan alınan bakteri sayısı 10^5 ile 10^8 kob/mL aralığında olduğunda enfeksiyon oluşabilmektedir. Alınan bakteri sayısının yanı sıra enfeksiyon oluşumunda *Salmonella* serotipi, suşun virulansı ve konak organizmanın savunması da etkili olmaktadır (Ustaçelebi, 1999).

Doğada yaygın olarak bulunan *Listeria monocytogenes*'in insanlarda enfeksiyon yapma sıklığının fazla olması beklenirken enfeksiyonların görülme sıklığı düşüktür. Bunun nedeni virulent (hastalık yapma özelliği olan) suştan yüksek dozda alınması gerekliliğidir. Hastalık oluşturma dozu kesin olarak bilinmemekle beraber etkilenen konağın bağışıklık sistemine ve alınan serotipin virulansına bağlı olarak değişmektedir. Sağlıklı kişilerde 10^4 kob/mL'den düşük düzeydeki *L. monocytogenes* sağlık açısından sorun oluşturmayabilir. *Clostridium difficile* sağlıklı yetişkin bireylerin bağırsak florasında bulunmamaktadır. Ancak kolon florasını değiştiren nedenler söz konusu olduğunda (ilaç ve ilaç dışı nedenler) mikroorganizma sporları açılarak bakteri çoğalır ve toksin salgılamaya başlar (Ustaçelebi, 1999). Aynı zamanda koyun ve kuzu bağırsak florasında da *Clostridium* suşlarına sıklıkla rastlanmamakla beraber doğal flora bozulduğunda mikroorganizma toksin salgılamakta ve hayvanda hastalığa neden olmaktadır (Knight ve Riley 2013; Uzal ve Songer 2008).

Sindirim sisteminde bağırsaklara ulaşana kadar mide asidi, çeşitli enzimlere maruz kalan patojen mikroorganizmalar bağırsak epitel hücrelerine ulaştıklarında buralara yerleşip çoğalarak, toksin ve diğer virülens etkenlere neden olurlar. Ancak bu durum bakterinin serotipi, enfeksiyona neden olan ve vücuda alınan bakteri sayısı, bağırsak hücrelerine tutunma yeteneği ile yakından ilişkilidir. Kişinin sahip olduğu bağışıklık sisteminin gücü, sağlam bağırsak yapısı patojen mikroorganizmalara karşı oldukça önemlidir. Ayrıca doğal bağırsak florası içerisinde yer alan laktik asit bakterilerinin bağırsaklarda yeterli sayıda olması da patojen mikroorganizmaların bağırsak hücrelerine tutunmasını engellemeye yardımcı olduklarını göstermiştir. Çalışmamızda *Listeria monocytogenes* ve *Clostridium difficile* gibi sağlıklı yetişkin bireylerin bağırsak florasında sıklıkla yer almayan ve hastalık yapan bakteri sayısı 10^4 kob/mL'den düşük düzeydeki bu iki mikroorganizmaya karşı izolatlar yüksek tutunma yüzdeleri vermişlerdir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında Türkiye genelinde Afyonkarahisar, Antalya, Erzincan, Isparta ve İzmir illerinden (44 adet peynir, 20 adet fermente sucuk, 9 adet çeşitli turşu, 2 adet liyofilize kırmızı biber, 3 adet tarhana ve 16 farklı taze meyve ve bitki) örnekler toplanarak izolasyon materyali olarak kullanılmıştır. İzolasyon için toplam 94 farklı örnek kullanılmıştır. Bunlardan 270 adet koloni seçilmiştir. Seçilen kolonilerin Gram özellikleri, katalaz aktiviteleri, pH 9.6 ve % 6.5 NaCl da gelişim ve glikozdan gaz üretme özelliklerinin belirlenmesinin ardından 69 adet izolatın *Lactobacillus* cinsine ait olabileceği düşünülerek probiyotik olma özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan testlere geçilmiştir.

Gastrointestinal sistemden geçiş yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla izolatlar *in vitro* ortamda mide ve bağırsaklardan geçiş yeteneklerini belirleyebilmek amacıyla çeşitli enzim ve metabolitlere karşı dayanımları belirlenmiştir. Bu analizler sonucunda başarılı olan 27 adet izolatın antibiyotik dirençlilikleri test edilmiştir. Suşların tamamı vankomisine dirençli bulunmuştur. Yedi adet izolatın kontrol amacıyla 24. saatte yapılan incelemesinde klindamisine (DA) karşı direnç geliştirdikleri görülmüştür. Bu izolatlar ağırlıklı olarak peynirden izole edilmişlerdir. Bunun klindamisinin süt hayvanlarının tedavisinde sıkça kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

İzolatların EPS üretimi ile kolesterol asimilasyon yetenekleri arasında kuvvetli bir bağlantı bulunamamıştır. Yüksek miktarda EPS üretimi olan *L. plantarum* DA255 suşu % 41.19 oranında kolesterol asimilasyonu gösterirken *L. lactis* DA268 suşu EPS üreticisi olmamasına rağmen % 60.71'lik bir kolesterol asimilasyonu göstermiştir. Bu durum izolatların kolesterol asimilasyonunu EPS üretiminden farklı mekanizmalar ile sağladığı sonucunu düşündürmektedir.

Antimikrobiyal analiz sonuçları yapılan çalışmalarla paralellik göstermekle beraber zonlar dökme plak yönteminde elde edilmiş olup. kuyucuk yönteminde herhangi bir zon elde edilememiştir. Bu durum nedeni olarak agar spot yönteminin metabolitlerin tamamını içermesinden kaynaklandığını düşünülmüştür ve

bağırsaklarda da canlıya canlı şeklinde patojen mikroorganizmalar ile karşılaştıkları için sonuçların olumlu olduğu düşünülmüştür.

Otoagregasyon ve koagregasyon yetenekleri suşdan suşa değişen bir özellik olmakla beraber bağırsak tutunması denemesi için seçilen suşların tamamının iyi bir otoagregasyon ve koagregasyon yeteneğine sahip oldukları belirlenmiştir. Bu sonuçlar bize tutunma denemesinde kullanılan laktik asit bakterilerinin yayınlarda bahsedilen otoagregasyon ve bağırsaklara tutunma yeteneklerini sağlayan S-katmanına sahip olup olmadıklarını merak ettirmiştir. Tutunma denemesinde kullanılan izolatların tutunma yeteneklerinin tam olarak öğrenilebilmesi için ilerleyen dönemlerde S-katmanı proteini varlığının tespit edilmesi izolatların probiyotik yeteneklerinin kanıtlanmasına katkı sağlayacak bir kriter olacağını göstermiştir.

Bağırsak tutunma deneyi sonucunda denemede kullanılan laktik asit bakterilerinin tamamı iyi bir canlılık oranı ile tamamlamışlardır. *L. casei* DA4, *L. plantarum* DA100 ve *L. plantarum* DA140 suşları gastrointestinal sistem denemelerinden başarı ile geçmiş ve iyi bir tutunma yüzdesi sergilemişlerdir. Bu izolatlar peynir ve turşudan izole edildikleri ve genel olarak probiyotik özellik gösteren suşlar arasında olduğu için sırasıyla peynir ve turşu izolatları olmaları nedeniyle beklenen sonuçları vermişlerdir. *W. cibaria* DA28 laktobasillere alternatif olarak probiyotik özellik sergileyen bir suş olarak karşımıza çıkmıştır. *L. coryniformis* DA263 turunc meyvesinden izole edilmiş olmasına karşın gastrointestinal sistem denemelerinden başarı ile geçmiş ve iyi bir tutunma yüzdesi sergilemişlerdir. Bu durum farklı bitkilerinde tutunma denemeleri için alternatif bir izolasyon kaynağı olabileceğini göstermiştir.

Çalışmamızda *L. monocytogenes* ve *C. difficile* gibi sağlıklı yetişkin bireylerin bağırsak florasında sıklıkla yer almayan ve hastalık yapan bakteri sayısı 10^4 kob/mL'den düşük düzeydeki bu iki mikroorganizmaya karşı izolatlar yüksek tutunma yüzdeleri vermişlerdir. Bu sonuçlar doğal bağırsak florası içerisinde yer alan laktik asit bakterilerinin bağırsaklarda yeterli sayıda olmasının patojen mikroorganizmaların bağırsak hücrelerine tutunmasını engellemeye yardımcı olduklarını göstermiştir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Aal, E.S.M., 2008. Effects Of Baking On Protein Digestibility Of Organic Spelt Products Determined By Two In Vitro Digestion Methods. *LWT - Food Science And Technology*, 41, 1282–1288.
- Adeniyi, B.A., Adetoye, A., Ayeni, F.A., 2015. Antibacterial Activities Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Cow Faeces Against Potential Enteric Pathogens. *African Health Science*, 15 (3), 88-95.
- Ahire, J., Bhat, A., Thakare, J.M., Pawar, P.B., Zope, D.G., Jain, R.M., Chaudhari, B.L., 2012. Cholesterol Assimilation and Biotransformation by *Lactobacillus helveticus*. *Biotechnology Letters*, 34, 103–107.
- Ahn, Y.T., Kim, G.B., Lim, K.S., Baek, Y.J., Kim, H.U., 2003. Deconjugation of Bile Salts by *Lactobacillus acidophilus* Isolates. *International of Dairy Journal*, 13, 303–311.
- Akman, M., 1967. Stafilokok'ların Lysozyme Yapımı Ve Bu Özelliğın Kriterler İle İlişkisi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 1, 4.
- Ali, A.A., 2010. Beneficial Role Of Lactic Acid Bacteria In Food Preservation And Human Health : A Review. *Research Of Microbiology*, 5 (12),1213-1221.
- Alp, D., Ertürkmen, P., 2017. Probiyotik Olarak Kullanılan *Lactobacillus* spp. Suşlarının Kolesterol Düşürücü Etkileri Ve Olası Mekanizmalar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(1), 108-113.
- Alp, G., Aslım, B., 2009. İnsan Bağırsak Sisteminde Probiyotik Olarak Bifidobakterilerin Önemi. *Anadolu Üniversitesi Bilim Ve Teknoloji Dergisi*, 10 (2), 343-354.
- Alp, G., Aslım, B., 2010. Relationship Between The Resistance To Bile Salts And Low pH With Exopolysaccharide (EPS) Production Of *Bifidobacterium* spp. Isolated From Infants Feces And Breast Milk. *Anaerobe*. 16, 101–105.
- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic Identification And In Situ Detection Of Individual Microbial Cells Without Cultivation. *Microbiological Reviews*, 59 (1), 143–169.
- Ammor, M.S., Florez, A.B., Van Hoek, A.H.A.M., De Los Reyes-Gavilan, C.G., Aarts, H.J.M., Margolles, A., Mayo, B., 2008. Molecular Characterization Of Intrinsic And Acquired Antibiotic Resistance In Lactic Acid Bacteria And Bifidobacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 14, 6–15.
- Anandharaj, M., Sivasankari, B., 2014. Isolation Of Potential Probiotic *Lactobacillus* Oris HMI68 From Mother's Milk With Cholesterol-Reducing Property. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118 (2), 153-159.

- Anandharaj, M., Sivasankari, B., Santhanakaruppu, R., Manimaran, M., Rani, R.P., Sivakumar, S., 2015. Determining The Probiotic Potential Of Cholesterol-Reducing *Lactobacillus* and *Weissella* Strains Isolated From Gherkins (Fermented Cucumber) and South Indian Fermented Koozh. *Research In Microbiology*, 166, 428–439.
- Anila, K., Kunzes, A., Bhalla, T.C., 2016. *In Vitro* Cholesterol Assimilation And Functional Enzymatic Activities Of Putative Probiotic *Lactobacillus* ssp. Isolated From Fermented Foods/Beverages of North West India. *Journal of Nutrition Food Science*, 6, (2).
- Arief, I.I., Jenie, B.S., Astawan, M., Kazuhito, F., Witarto, A.B., 2015. Identification and Probiotic Characteristics of Lactic Acid Bacteria Isolated from Indonesian Local Beef. *Asian-Australas. Journal Animal Science*, 9 (1), 25-36.
- Ashraf, R., Smith, S.C., 2016. Commercial Lactic Acid Bacteria And Probiotic Strains-Tolerance To Bile, Pepsin And Antibiotics. *International Food Research Journal*, 23 (2), 777-789.
- Aslım, B., Onal, D., Beyath, Y., 2007. Factors Influencing Autoaggregation And Aggregation Of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Isolated From Handmade Yogurt. *Journal Of Food Protection*, 70 (1), 223–227.
- Aslım, B., Tok, E., 2007. Probiyotik Olarak Kullanılan Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Kolesterol Asimilasyonu Ve Safra Tuzları Dekonjugasyonundaki Rollerini. *Türk Mikrobiyol Cemiyeti Dergisi*, 37 (1), 62-68.
- Axelsson, L.T., Chung, T.C., Dobrogosz, W.J., Lindgren, S.E., 1989. Production Of A Broad Spectrum Antimicrobial Substance By *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology In Health And Disease*, 2 (2), 131-136.
- Balamurugan, R., Chandragunasekaran, A.S., Chellappan, G., Rajaram, K., Balakrishnan, G., Ramakrishna, S., 2014. Probiotic Potential Of Lactic Acid Bacteria Present In Home Made Curd In Southern India. *Indian Journal of Medical Reseruces*, 140, 345-355.
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S.K., 2016. Methods For In Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. *Journal Of Pharmaceutical Analysis*, 6, 71–79.
- Baştürk, B., Boyacıoğlu, S., 2005. Mukozal İmmün Sistem: Galt. Nalt Ve Balt. *Güncel Gastroenteroloji*, 9 (2), 120-125.
- Başığit, G., 2004. Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Olma Özelliklerinin Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. Isparta. 72 sayfa.

- Belviso, S., Giordano, M., Zeppa, P.D.G., 2009. *In Vitro* Cholesterol-Lowering Activity of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paracasei* Strains Isolated from the Italian Castelmagno PDO Cheese. *Dairy Science Technology*, 89, 169–176.
- Berg, R.D., 1996. The Indigenous Gastrointestinal Microflora. *Trends In Microbiology*, 4 (11), 430-435.
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorrente, C., Gil, A., 2012. Probiotic Mechanisms Of Action. *Ann Nutrient Metabolism*, 61, 160–174.
- Bilkova, A., Sepova, H.K., Bukovsky, M., Bezakova, L., 2011. Antibacterial Potential Of *Lactobacilli* Isolated From A Lamb. *Veterinari Medicina*, 56 (7), 319–324.
- Boels, C.I., Kranenburg, R.V., Hugenholtz, J., Kleerebezem, M., Vos, W.M.D., 2001. "Sugar Catabolism And Its Impact On The Biosynthesis And Engineering Of Exopolysaccharide Production In Lactic Acid Bacteria". *International Dairy Journal*, 11, 723–732.
- Boisen, S., Eggum, B.O., 1991. Critical Evaluation Of In Vitro Methods For Estimating Digestibility In Simple-Stomach Animals. *Nutrition Research Reviews*, 4, 141-162.
- Bublin, M., Radauer, C., Knulst, A., Wagner, S., Scheiner, O., Mackie, A.R., Clare, E.R., Breiteneder, H., 2008. Effects Of Gastrointestinal Digestion And Heating On The Allergenicity Of The Kiwi Allergens Act D 1. Actinidin. And Act D 2. A Thaumatin-Like Protein. *Molecular Nutrition Food Resources*, 52, 1130 – 1139.
- Bubnov, R.V., Babenko, L.P., Lazarenko, L.M., Mokrozub, V.V., Spivak, M.Y., 2018. Specific Properties Of Probiotic Strains: Relevance And Benefits For The Host. *EPMA Journal*, 9, 205–223.
- Bujakova, D., Vlkova, E., Rada, V., Kímet, V., 2003. Aggregation Of *Lactobacilli* And *Bifidobacteria* With *Escherichia coli* O157:H7. *Folia Microbiology*, 49 (2), 143–146.
- Burhan, H.S.A., Priyambada, E., Arief, I.I., 2017. Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Dangke and Indonesian Beef as Hypocholesterolaemic Agent. *Media Peternakan*, 40 (2), 136-142.
- Can, Ö.P., 2007. Probiyotik Mikroorganizmaların Yararları. *Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları*, 107-110.
- Cariolato, D., Andrighetto, C., Lombardi, A., 2008. Occurrence of Virulence Factors and Antibiotic Resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Collected from Dairy and Human Samples in North Italy. *Food Control*, 19, 886-892.

- Castorena-Alba, M.M., Vázquez-Rodríguez, J.A., López-Cabanillas Lomelí, M., González-Martínez, B.E., 2017. Cholesterol Assimilation. Acid And Bile Survival Of Probiotic Bacteria Isolated From Food And Reference Strains. *CYTA*, 1 (16), 36–41.
- Ceyhan, N., Aliç, H., 2012. Bağırsak Mikroflorası Ve Probiyotikler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 5 (1), 107-113.
- Champe, P.C., Harvey, R.A., 1997. *Biyokimya*. 2. baskı. Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul. 205.
- Chang-Qing, Y., Li Rong, L., 2015. Cloning and Expression of Bile Salt Hydrolase Gene from *Lactobacillus plantarum* M1-Uvs29. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)*, 22, (2) 60-66.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, K.J., 1998. Antibiotic Susceptibility Of Potentially Probiotic *Lactobacillus* Species. *Journal Of Food Protection*, 61 (12),1636-1643.
- Cholakov, R., Yanakieva, V., Denkova, Z., Sotirova, E., 2014. Probiotic Properties Of *Lactobacillus plantarum* Bg24. Isolated From Naturally Fermented Cereal Beverage. *Научни Трудове На Русенския Университет*, 10 (2), 46-50.
- Choudhary, J., Dubey, R.C., Sengar, G., Dheeman, S., 2018. Evaluation Of Probiotic Potential And Safety Assessment Of *Lactobacillus pentosus* MMP4 Isolated From Mare’s Lactation. *Probiotics And Antimicrobial Proteins*, 20, 1-10.
- Coeuret, V., Dubernet, S., Marion, B., Gueguen, M., Vernoux, J.P., 2003. Isolation. Characterization and Identification of *Lactobacilli* Focusing Mainly on Cheeses and Other Dairy Products, 83, 269–306.
- Collado, M.C., San, Y., 2008. Method For Direct Selection Of Potentially Probiotic *Bifidobacterium* Strains From Human Feces Based On Their Acid-Adaptation Ability. *Journal Of Microbiological Methods*, 66, 560–563.
- Coman, M.M., Verdenelli, M.C., Cecchini, C., Silvi, S., Orpianesi, C., Boyko, N., Cresci, A., 2014. In Vitro Evaluation Of Antimicrobial Activity Of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501. *Lactobacillus paracasei* IMC 502 And SYN BIO Against Pathogens. *Journal Of Applied Microbiology*, 117, 518-527.
- Commane, D., Hughes, R., Shortt, C., Rowland, I., 2005. The Potential Mechanisms Involved In The Anti-Carcinogenic Action Of Probiotics. *Mutation Research*, 591, 276–289.
- Conrad, R., Vlassov, A., 2015. The Human Microbiota: Composition. Functions. And Therapeutic Potential. *Medical Science Review*, 2, 92-103.

- Corcoran, B.M., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Rossi, R.P., 2005. Survival Of Probiotic Lactobacilli In Acidic Environments Is Enhanced In The Presence Of Metabolizable Sugars. *Applied And Environmental Microbiology*, 71 (6), 3060–3067.
- Coşkun, T., 2006. Pro-Pre ve Sinbiyotikler. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 49, 128-148.
- Çadırcı, B.H., Çitak, S., 2010. Antagonistic Effects Of Some Lactobacilli On Some Gram-Negative Bacteria. *Gazi University Journal Of Science*, 23 (2), 119-123.
- Çakır, İ., 2003. Laktobasil Ve Bifidobakterlerde Bazı Probiyotik Özelliklerin Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi. Ankara.
- Çakır, İ., Çakmakçı, M.L., 2004. Probiyotikler: Tanımı. Etki Mekanizması. Seçim Ve Güvenilirlik Kriteri. *Gıda*, 29 (6), 427-434.
- Çavuşoğlu, H. (çeviri ed.) 2001. *Tıbbi Fizyoloji*.10. Baskıdan Çeviri. Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul. Türkiye.753.
- Çelebi, G., Uygun, A., 2013. İntestinal Mikrobiyota Ve Fekal Transplantasyon. *Güncel Gastroenteroloji*, 17 (2), 148-157.
- Çetin, H., Öktem, F., Örmeci, A.R., Yorgancıgil, B., Yaylı, G., 2006. Çocukluk Çağı İdrar Yolu Enfeksiyonlarında *Escherichia coli* Ve Antibiyotik Direnci. *S.D.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, 13 (2), 12-16.
- Çon, A.H., Gökalp, H.Y., 2001. Production Of Bacteriocin-Like Metabolites By Lactic Acid Cultures Isolated From Sucuk Samples. *Meat Science*, 55, 89-96.
- D'Argenio, V., Salvatore, F., 2015. The Role Of The Gut Microbiome In The Healthy Adult Status. *Clinica Chimica Acta*, 451, 97–102.
- Dasari, S., Shouri, R.D.D., Wudayagiri, R., Valluru, L., 2014. Antimicrobial Activity Of *Lactobacillus* Against Microbial Flora Of Cervicovaginal Infections. *Asian Pacific Journal Trop Dis*, 4 (1), 18-24.
- Demir, E., Kaygusuz, E., Kılıç, G., Yüce, S., Soyuçok, A., 2017. Yoğurt Örneklerinden İzole Edilmiş Laktik Asit Bakterilerinin Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması Ve Ekzopolisakkarit Üretimlerinin Belirlenmesi. *MAKÜ FEBED*, 8 (Ek Sayı 1), 262-267.
- Denkova, R., Ilieva, S., Dimbareva, D., Denkova, Z., 2012. Probiotic Properties Of *Lactobacillus acidophilus* Z10. Isolated From Naturally Fermented Sourdough. *Food And Environment Safety*, 11 (3), 15-20.

- Dias, R., Vilas-Boas, E., Campos, F.M., Hogg, T., Couto, J.A., 2015. Activity of lysozyme on *Lactobacillus hilgardii* strains isolated from Port wine. *Food Microbiology*, 49, 6-11.
- Dilna, S.V., Surya, H., Aswathy, R.G., Varsha, K., Sakthikumar, D.N., Pandey, A., Nampoothiri, K.M., 2015. Characterization of an Exopolysaccharide with Potential Health Benefit Properties from a Probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. *JFST*, 64, 1179-1186.
- Dixit, G., Samarth, D., Bhadekar, R., 2013. Comparative Studies On Potential Probiotic Characteristics Of *Lactobacillus acidophilus* Strains. *Eurasia Journal Bioscience*, 7, 1-9.
- Doğan, M., 2012. Probiyotik Bakterilerin Gastrointestinal Sistemdeki Etki Mekanizması. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 7 (1), 20-27.
Doi: <https://doi.org/10.5398/medpet.2017.40.2.136>.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J.C., Galindo, S.S., 2012. “Microbial Exopolysaccharides: Main Examples Of Synthesis. Excretion. Genetics And Extraction”. *Carbohydrate Polymers*, 87, 951– 962.
- Dowarah, R., Verma, A.K., Agarwal, N., Singh, P., Singh, B.R., 2018. Selection And Characterization Of Probiotic Lactic Acid Bacteria And Its Impact On Growth. Nutrient Digestibility. Health And Antioxidant Status In Weaned Piglets. *Plos One*, 8, 1-24.
- Eden, C.S., Eriksson, B., Hanson, L.A., 1977. Adhesion Of *Escherichia coli* To Human Uroepithelial Cells *In vitro*. *Infection And Immunity*, 18(3), 767-774.
- Ekmekci, H., Aslim, B., Ozturk, S. 2009. Characterization Of Vaginal Lactobacilli Coaggregation Ability With *Escherichia coli*. *Microbiol Immunol*, 53, 59–65.
- Ergene, E., Avcı, A., 2016. Mikrobiyel Ekzopolisakkaritler. *Saü Fen Bil Der* 20 (2), 193-202.
- Eryılmaz, F., 2011. Vajinal Sekresyondan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerine Ait Bazı Suşların Potansiyel Probiyotik Özelliklerin Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü. Doktora Tezi. 95 Sayfa. Ankara.
- Facklam, R., Hollis, D., Collins, M.D., 1989. Identification of Gram—Positive Coccal and Coccobacillary Vancomycin—Resistant Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 724—730.
- Feng, M., Chen, X., Li, C., Nurgul, R., Dong, M., 2012. Isolation And Identification Of An Exopolysaccharide-Producing Lactic Acid Bacterium Strain From Chinese Paocai And Biosorption Of Pb(II) By Its Exopolysaccharide. *Journal of Food Science*, 77 (6), 11-117.
- Ferrer, M., Méndez García, C., Rojo, D., Barbas, C., Moya, A., 2017. Antibiotic Use and Microbiome Funcion. *Biochemical Pharmacology*, 134, 114-126.

- Florez, A.B., Danielsen, M., Korhonen, J., Zycka, J., Wright, A., Bardowski, J., Mayo, B., 2007. Antibiotic Survey Of *Lactococcus lactis* Strains To Six Antibiotics By Etest. And Establishment Of New Susceptibility-Resistance Cut-Off Values. *Journal Of Dairy Research*, 74, 262–268.
- Frece, J., Kos, B., Svetec, I.K., Zgaga, Z., Mrsa, V., Suskovic, J., 2005. Importance Of S-Layer Proteins In Probiotic Activity Of *Lactobacillus acidophilus* M92 . *Journal Of Applied Microbiology*, 98, 285–292.
- Freeman, H.J., Thomson, A.B.R., 2017. The Small Intestine. *First Principles Of Gastroenterology*, 175-257.
- Fukao, M., Yajima, N., 2012. Assessment Of Antibiotic Resistance In Probiotic *Lactobacilli*. *Antibiotic Resistant Bacteria – A Continuous Challenge In The New Millennium*, 503-513.
- Fuller, R., 1991. Probiotics In Human Medicine. *Gut*, 32, 439-442.
- Gaamouche, S., Arakrak, A., Bakkali, M., Laglaoui, A., 2014. Antimicrobial Activity Of Lactic Acid Bacteria And Bacteriocins Isolated From A Traditional Brine Table Olives Against Pathogenic Bacteria. *International Journal Of Current Microbiology Applied Science*, 3 (11), 657-666.
- Gad, G.F., Abdel-Hamid, A.M., Farag, Z.S.H., 2014. Antibiotic Resistance In Lactic Acid Bacteria Isolated From Some Pharmaceutical And Dairy Products. *Brazilian Journal Of Microbiology*, 45 (1), 25-33.
- Geçim, E.İ., 2005. *Cerrahinin İlkeleri*. Yedinci Edisyon. Mc Graw-Hill Companies. Ankara.
- Giles-Gomez, M., García, J.G.S., Matus, V., Quintana, I.C., Bolívar, F., Escalante, A., 2016. In Vitro And In Vivo Probiotic Assessment Of *Leuconostoc mesenteroides* P45 Isolated From Pulque. a Mexican Traditional Alcoholic Beverage. *Springer Plus*, 5, 708.
- Gill, H.S., Guarner, F., 2004. Probiotics and Human Health: A Clinical Perspective. *Postgrad Med Journal*, 80, 516-526. Doi: 10.1136/pgmj.2003.008664.
- Gilliland, S.E., Nelson, C.R., Maxwell, C., 1985. Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied Environment Microbiology*, 49, 377.
- Goh, J.Y., Klaenhammer, T.R., 2010. Functional Roles Of Aggregation-Promoting-Like Factor In Stress Tolerance And Adherence Of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied And Environmental Microbiology*, 76 (15), 5005–5012.
- Goudercourt, D.C.P.D., Dennin, V., Leyer, G., Pot, B., 2006. Selecting Lactic Acid Bacteria For Their Safety And Functionality By Use Of A Mouse Colitis Model. *Applied And Environmental Microbiology*, 72 (9), 5799–5805.

- Göçer, E.M., Ergin, F., Küçükçetin, A., 2016. Sindirim Sistemi Modellerinde Probiyotik Mikroorganizmaların Canlılığı. Akademik Gıda, 14 (2), 158-165.
- Gulbe, G., Valdovska, A., Saulite, V., Jevgenijs, J., 2015. *In Vitro* Assessment For Antimicrobial Activity Of *Lactobacillus helveticus* And Its Natural Glycopeptides Against Mastitis Causing Pathogens In Dairy Cattle. The Open Biotechnology Journal, 9, 61-66.
- Gür, F., Güzel, M., Öncül, N., Yıldırım, Z., Yıldırım, M., 2010. Süt Serum Proteinleri Ve Türevlerinin Biyolojik Ve Fizyolojik Aktiviteleri. Akademik Gıda, 8 (1), 23-31.
- Gürsoy, O., Kınık, Ö., Gönen, İ., 2005. Probiyotikler Ve Gastrointestinal Sağlığa Etkileri. Türk Mikrobiyol Cemiyeti Dergisi, 35, 136-148.
- Harzallah, D., Belhadj, H., 2013. Lactic Acid Bacteria As Probiotics: Characteristics. Selection Criteria And Role In Immunomodulation Of Human Gı Muccosal Barrier. Actic Acid Bacteria - R & D For Food. Health And Livestock Purposes Chapter 8, 197-216.
- He, F., Ouwehand, A.C., Isolauri, E., Hosoda, M., Benno, Y., Salminen, S., 2001. Differences In Composition And Mucosal Adhesion Of *Bifidobacteria* Isolated From Healthy Adults And Healthy Seniors. Current Microbiology, 43, 351-354.
- Hevia, A., Delgado, S., Sánchez, B., Margolles, A., 2015. Molecular Players Involved In The Interaction Between Beneficial Bacteria And The Immune System. Frontiers In Microbiology, 6, 1285.
- Hofmann, A.F., Molino, G., Milanese, M., Belforte, G., 1983. Description And Simulation Of A Physiological Pharmacokinetic Model For The Metabolism And Enterohepatic Circulation Of Bile Acids In Man. Compartmental Model Of Cholic Acid In Man. Journal of. Clinical. Invest, 71, 1003-1022.
- Horáčková, S., Plocková, M., Demnerová, K., 2017. Importance Of Microbial Defence Systems To Bile Salts And Mechanisms Of Serum Cholesterol Reduction. Biotechnology Advances.
- Hove, H., Nùrgaard, H., Mortensen, P.B., 1999. Lactic Acid Bacteria And The Human Gastrointestinal Tract. European Journal Of Clinical Nutrition, 53, 339-350.
- Hur, S.J., Lim, B.O., Decker, E.A., Mcclements, D.J., 2011. In Vitro Human Digestion Models For Food Applications. Food Chemistry, 125, 1-12.
- Iranmanesh, M., Ezzatpanah, H., Mojjani, N., 2014. Antibacterial Activity And Cholesterol Assimilation Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Traditional Iranian Dairy Products. Food Science And Technology, 58, 355-359.

- Jamalifar, H., Rahimi, H.R., Samadi, N., Shahverdi, A.R., Sharifian, Z., Hosseini, F., Eslahi, H., Fazeli, M.R., 2011. Antimicrobial Activity Of Different *Lactobacillus* Species Against Multi-Drug Resistant Clinical Isolates Of *Pseudomonas aeruginosa*. Iranian Journal Of Microbiology, 3 (1), 21-25.
- Jamaly, N., Benjouad, A., Bouksaim, M., 2011. Probiotic Potential Of *Lactobacillus* Strains Isolated From Known Popular Traditional Moroccan Dairy Products. British Microbiology Research Journal, 1 (4), 79–94.
- Johnson, B., Selle, K., O’Flaherty, S., Goh, Y.J., Klaenhammer, T., 2013. Identification Of Extracellular Surface-Layer Associated Proteins In *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Microbiology, 159, 2269–2282.
- Kalia, M., Isolauri, E., Soppi, E., Virtanen, E., Laine, S., Arvilommi, E., 1992. Enhancement Of The Circulating Antibody Secreting Cell Response In Human Diarrhea By A Human *Lactobacillus* Strain. International Pediatric Research Foundation, 32 (2), 141-144.
- Kang, M., Na, H., Oh, J., 2005. Coaggregation Ability Of *Weissella cibaria* Isolates With *Fusobacterium nucleatum* And Their Adhesiveness To Epithelial Cells. FEMS Microbiology Letters, 253, 323–329.
- Kankaya, D., Özden-Tuncer, B., Tuncer, Y., 2017. Gıda Kaynaklı Enterokokların Potansiyel Risk Faktörleri. Gıda, 42 (1), 8-19.
- Kaur, I.P., Chopra, K., Saini, A., 2002. Probiotics: Potential Pharmaceutical Applications. European Federation for Pharmaceutical Sciences, 15, 1–9.
- Kawther, E.L.S., Tawfik, N.F., Dabiza, M.A., Sharaf, O.M., Effat, B.A., 2010. In Vitro Assessment Of Gastrointestinal Viability Of Potentially Probiotic *Lactobacilli*. Journal Of American Science, 6, 11-15.
- Kerkhof, E.G., Ungell, A.B., Sjöberg, A.K., De Jager, M.H., Hilgendorf, C., De Graaf, I.A.M., Groothuis, G.M.M., 2006. Innovative Methods To Study Human Intestinal Drug Metabolism In Vitro: Precision-Cut Slices Compared With Ussing Chamber Preparations. Drug Metabolism And Disposition. 34 (11), 1893-1902.
- Kılıç, G., Kuleaşan, H., Sömer, V.F., Akpınar, D., 2013. Determining Potential Probiotic Properties Of Human Originated *Lactobacillus plantarum* Strains. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 18, 479-485.
- Kımet, V., Lucchini, F., 1997. Aggregation-Promoting Factor In Human Vaginal *Lactobacillus* Strains. FEMS Immunology And Medical Microbiology, 19, 111-114.
- Knight, D.R., Riley, T.V., 2013. Prevalence Of *Clostridium difficile* Gastrointestinal Carriage In Australian Sheep And Lambs. Applied Environment Microbiology, Doi:10.1128/AEM.01888-13.

- Koca, T.T., 2015. Bağırsak Mikroflorasının İnflamatuvar Hastalık Patogenezindeki Yeri. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 24 (1), 78-91.
- Kolenbrander, P.E., Andersen, R.N., Moore, A.V.H., 1990. Intrageneric Coaggregation Among Strains Of Human Oral Bacteria: Potential Role In Primary Colonization Of The Tooth Surface. Applied And Environmental Microbiology, 56 (12), 3890-3894.
- Kong, F., Singh, R.P., 2010. A Human Gastric Simulator (HGS) To Study Food Digestion In Human Stomach. Journal Of Food Science, 75 (9), 627-635.
- Kopp-Hoolihan, L., 2001. Prophylactic and Therapeutic Uses of Probiotics: A Review. Journal of American Diet Associate, 101, 229-241.
- Korhonen, J.M., Van Hoek, A.H.A.M., Saarela, M., Huys, G., Tosi, L., Mayrhofer, S., Von Wright, A., 2010. Antimicrobial Susceptibility Of *Lactobacillus rhamnosus*. Beneficial Microbes, 1 (1), 75-80.
- Kos, B., Suskovic, J., Vukovic, S., Simpraga, M., Frece, J., Matosic, S., 2003. Adhesion And Aggregation Ability Of Probiotic Strain *Lactobacillus acidophilus* M92. Journal Of Applied Microbiology, 94, 981-987.
- Kučan, M., Gobin, I., Markov, K., Momčilović, D.J., Frece, J., 2012. Testing The Adhesion And Colonization Ability Of *Lactobacillus plantarum* Strain S1 To The Mice Intestinal Epithelium. International Journal Of Sanitary Engineering Research, 6 (1), 25-30.
- Lau, L.Y., Chye, F.Y., 2018. Antagonistic Effects Of *Lactobacillus plantarum* 0612 On The Adhesion Of Selected Foodborne Enteropathogens In Various Colonic Environments. Food Control, 91, 237-247.
- Laurens-Hattingh, A., Viljoen, B.C., 2001. Yogurt As Probiotic Carrier Food. Internationel Dairy Journal, 11, 1-17.
- Le, B., Yang, S.H., 2018. Isolation Of *Weissella* Strains As Potent Probiotics To Improve Antioxidant Activity Of Salted Squid By Fermentation. Journal Of Applied Biology Chemical, 61 (1), 93-100.
- Lehto, E.M., Salminen, S.J., 1997. Inhibition of *Salmonella typhimurium* adhesion to Caco-2 cell cultures by *Lactobacillus* strain GG spent culture supernate: only a pH effect?. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 18, 125-132.
- Lertcanawanichakul, M., Kannai, J., Wongmuang, P., Tharaporn, S., 2015. Cholesterol-Lowering Potentials Of Lactic Acid Bacteria With Potential Probiotic Properties. International Journal of Pharmtech Research, 7 (3), 463-470.

- Li, Q., Liu, X., Dong, M., Zhou, J., Wang, Y., 2015. Aggregation And Adhesion Abilities Of 18 Lactic Acid Bacteria Strains Isolated From Traditional Fermented Food. *International Journal Of Agricultural Policy And Research*, 3 (2), 84-92.
- Mackie, R.I., Sghir, A., Gaskins, H.A., 1999. Developmental Microbial Ecology Of The Neonatal Gastrointestinal Tract. *Am Journal of Clinical Nutrition*, 69, 1035–1045.
- Magalhaes, J.G., Tattoli, I., Girardin, S.E., 2007. The Intestinal Epithelial Barrier: How To Distinguish Between The Microbial Flora And Pathogens. *Seminars In Immunology*, 19, 106–115.
- Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., Tsakalidou, E., 2006. Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains Isolated from Dairy Products. *International Dairy Journal*, 16, 189-199.
- Meng, J., Zhang, Q., Lu, R., 2017. Surface Layer Protein From *Lactobacillus acidophilus* NCFM Inhibit intestinal Pathogen-Induced Apoptosis In HT-29 Cells. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 96, 766–774.
- Minervini, F., Angelis, M.D., Surico, R.F., Ganzle, M., Gobbetti, M., 2010. “Highly Efficient Synthesis Of Exopolysaccharides By *Lactobacillus curvatus* DPPMA10 During Growth In Hydrolyzed Wheat Flour Agar”. *International Journal Of Food Microbiology*, 141, 130–13.
- Moal, V.L., Servin, A.L., 2014. Anti-Infective Activities Of *Lactobacillus* Strains In The Human Intestinal Microbiota: From Probiotics To Gastrointestinal Anti-Infectious Biotherapeutic Agents. *Clinical Microbiology Review*, 27 (2), 167–199.
- Montalto, M., D’Onofrio, F., Gallo, A., Cazzato, A., Gasbarrini, G., 2009. Intestinal Microbiota And Its Functions. *Digestive And Liver Disease Supplements*, 3 30–34.
- Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A., Lodi, R., 2006. Technological And Molecular Characterisation Of *Enterococci* Isolated From North–West Italian Dairy Products. *International Dairy of Journal*, 16, 867–875.
- Murphy, K., Curley, D., O’callaghan, T.F., O’shea, C., Dempsey, E.M., O’toole, P. W., Ross, R., Ryan, C.A., Stanton, C., 2017. The Composition Of Human Milk And Infant Faecal Microbiota Over The First Three Months Of Life: A Pilot Study. *Scientific Reports*, 1-10.
- Neish, A.S., 2002. The Gut Microflora And Intestinal Epithelial Cells: A Continuing Dialogue. *Microbes And Infection*, 4, 309–317.

- Nigam, A., Kumar, A.M., Bhola, N., 2012. In Vitro Screening Of Antibacterial Activity Of Lactic Acid Bacteria Against Common Enteric Pathogens. *Journal Of Biomedical Sciences*, 1 (4:2), 1-6.
- Noh, D.O., Kim, S.H., Gilliland, S.E., 1997. Incorporation of Cholesterol Into the Cellular Membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *Journal of Dairy Science*, 80 (12), 3107-3113.
- O'Hara, O.A., Shanahan, F., 2006. The Gut Flora As A Forgotten Organ. *European Molecular Biology Organization*, 7 (7), 688-693.
- Ojetti, V., Gigante, G., Ainora, M.E., Fiore, M., Barbaro, F., Gasbarrini, A., 2009. Microflora Imbalance And Gastrointestinal Diseases. *Digestive And Liver Disease Supplements*, 3, 35-39.
- Oldak, A., Zielinska, D., Rzepkowska, A., Kobohyn-Krajewska, D., 2017. Comparison Of Antibacterial Activity Of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated From Two Different Kinds Of Regional Cheeses From Poland: Oscypek And Korycinski Cheese. *Biomed Research International*.
- Olejnik, A., Lewandowska, M., Obarska, M., Grajek, W., 2005. Tolerance Of *Lactobacillus* And *Bifidobacterium* strains To Low Ph, Bile Salts And Digestive Enzymes. *Electronic Journal Of Polish Agricultural Universities (EJPAU)*, 8 (1), 1-13.
- Ossowski, I., Satokari, R., Reunanen, J., Lebeer, S., Keersmaecker, S., Vanderleyden, J., Vos, W.M., Palva, A., 2011. Functional Characterization Of A Mucus-Specific LPXTG Surface Adhesin From Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied And Environmental Microbiology*, 77 (13), 4465-4472.
- Ouwehand, A., Isolauri, E., Salminen, S., 2003. The Role Of The Intestinal Microflora For The Development Of The Immune System In Early Childhood. *European Journal of Nutrition*, 41 (1), 32-37.
- Öncül, O., 2010. Vankomisin Ve Teikoplanin Hikayesi. *Ankem Dergisi*, 24 (Ek 2), 101-109.
- Özdoğan, D., 2011. *Lactococcus Lactis subsp. lactis* L127 Suşunun Probiyotik Özellikleri. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi. Ankara. 62 Sayfa.
- Pessione, E., 2012. Lactic Acid Bacteria Contribution To Gut Microbiota Complexity: Lights And Shadows. *Frontiers In Cellular And Infection Microbiology*, 2, 1-15.
- Pilar, C.M., Arlindo, S., Boehme, K., Miguel, T., Pascoal, A., Barros-Velazquez, J., 2008. Current Applications And Future Trends Of Lactic Acid Bacteria And Their Bacteriocins For The Biopreservation Of Aquatic Food Products. *Food Bioprocess Technology*, 1, 43-63.

- Pinto, M.G., Franz, C.M.A.P., Schillinger, U., Holzapfel, W.H., 2006. *Lactobacillus* spp. With In Vitro Probiotic Properties From Human Faeces And Traditional Fermented Products. *International Journal Of Food Microbiology*, 109, 205–214.
- Pozza, M.S., Miglioranza, L.H., Garcia, J.E., Garcia, S., Pozza, P.C., 2011. Human Gastrointestinal Tract Resistance Of *Lactobacillus* Strains Isolated From Infant Faeces. *Semina: Ciências Agrárias*. Londrina, 32 (3), 1021-1032.
- Quinto, R.J., Jiménez, P., Caro, I., Tejero, J., Mateo, J., Girbés, T., 2014. Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food And Nutrition Sciences*, 5, 1765-1775.
- Rajoka, M.R., Hayat, H.F., Sarwar, S., Mehwish, H.M., Ahmad, F., Hussain, N., Shah, S.Z.H., Khurshid, M., Siddiqu, M., Shi, J., 2018. Isolation And Evaluation Of Probiotic Potential Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Poultry Intestine. *Microbiology*, 87 (1), 116–126.
- Rasic, J.L., Vujicic, I.F., Skrinjar, M., Vulic, M., 1992. Assimilation Of Cholesterol By Some Cultures Of Lactic Acid Bacteria And Bifidobacteria. *Biotechnology Letters*, 14, 39-44.
- Riaz, M.S., Shaheen, T., Siddiq, M., Nadeem, A., Hussain, A., Hayyat, F., Shi, J., 2015. *In Vitro* Assessment Of Probiotic Potential Of Lactic Acid Bacteria. *J. Biol. Today's World*, 4 (10), 190-198.
- Rogers, K., 2011. The Digestive System. *Britannica Educational Publish In Association With Rosen Educational Services*. 258 sayfa.
- Roxas, M., 2008. The Role Of Enzyme Supplementation In Digestive Disorders. *Alternative Medicine Review*, 13 (4), 307-314.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonde'N, R., Matto, T., Mattila-Sandholm, T., 2000. Probiotic Bacteria: Safety. Functional And Technological Properties. *Journal Of Biotechnology*, 84, 197–215.
- Sadrani, H., Dave, J., Bhartkumar, R., Vyas, M., 2014. Screening Of Potential Probiotic *Lactobacillus* Strains Isolated From Fermented Foods. *Fruits And Of Human Origin. Asian Journal of Pharm Clinical Reseures* 7 (2), 216-225
- Sağlam, H., 2013. Tanımlanmış *Lactobacillus plantarum* Suşlarının Plazmit Profilleri Ve Bunların Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi. 124s.
- Sahadeva, R.P.K., Leong, S.F., Chua, K.H., Tan, C.H., Chan, H.Y., Tong, E.V., Wong, S.Y.W., Chan, H.K., 2011. Survival Of Commercial Probiotic Strains To Ph And Bile. *International Food Research Journal*, 18 (4), 1515-1522.

- Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.C., Cummings, J.H., Franck, A., Gibson, G.R., Isolauri, E., Roberfroid, M., Rowland, I., 1998. Functional Food Science And Gastrointestinal Physiology And Function. *British Journal Of Nutrition*, 80 (1), 147-171.
- Salminen, S.J., Gueimonde, M., Isolauri, E., 2005. Probiotics That Modify Disease Risk. *Journal of Nutrition*, 135, 1294–1298.
- Sara, M., Sleytr, U.B., 2000. S-Layer Proteins. *Journal Of Bacteriology*, 182 (4), 859-868.
- Schillinger, U., Lücke, F.K., 1989. Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* Isolated from Meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1901-1906.
- Schrezenmeir, J., De Vrese, M., 2001. Probiotics. Prebiotics And Synbiotics- Approaching A Definition. *Am Journal of Clinical Nutrition*, 73, 361-400.
- Sears, C.L., 2005. A Dynamic Partnership: Celebrating our Gut Flora. *Anaerobe*, 11, 247–251.
- Sekirov, I., Russell, S.L., Caetanom, Antunes, L., Finlay, B., 2010. Gut Microbiota In Health And Disease. *Physiol Review*, 90, 859–904.
- Serino, M., Luche, E., Chabo, C., Amar, J., Burcelin, R., 2009. Intestinal Microflora And Metabolic Diseases. *Diabetes & Metabolism*, 35, 262–272.
- Sharma, K., Sharma, N., Sharma, R., 2016. Identification and Evaluation of *In vitro* Probiotic Attributes of Novel and Potential Strains of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Dairy Products of North-West Himalayas. *Journal of Clinical Microbiology Biochemical Technology*, 2 (1), 18-25.
- Sidira, M., Kourkoutas, Y., Kanellaki, M., Charalampopoulos, D., 2015. In Vitro Study On The Cell Adhesion Ability Of Immobilized Lactobacilli On Natural Supports. *Food Research International*, 76, 532–539.
- Singha, T.H., 2012. Microbial Extracellular Polymeric Substances: Production. Isolation And Applications. *Iosr Journal Of Pharmacy*, 2 (2), 276-281.
- Smitinont, T., Tansakul, C., Tanasupawat, T., Keeratipibul, S., Navarini, L., Bosco, M., Cescutti, P., 1999. Exopolysaccharide-Producing Lactic Acid Bacteria Strains From Traditional Thai Fermented Foods: Isolation. Identification And Exopolysaccharide Characterization. *International Journal of Food Microbiology*, 51, 105–111.
- Soliman, A.H.S., Sharoba, A.M., Bahlol, H.E.M., Soliman, A.S., Radi, O.M.M., 2015. Evaluation Of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* And *Lactobacillus plantarum* For Probiotic Characteristics. *MEJAS*, 5 (1), 10–18.

- Söke, S., 2017. Bağırsak Histolojisi. [Http://Www.Dicle.Edu.Tr/Contents/C81837ba-E9af-4a49-9ac0-27036d37bb32.Pdf](http://Www.Dicle.Edu.Tr/Contents/C81837ba-E9af-4a49-9ac0-27036d37bb32.Pdf)
- Stieglmeier, M., Wirth, R., Kminek, G., Moissl-Eichinger, C., 2009. Cultivation Of Anaerobic And Facultatively Anaerobic Bacteria From Spacecraft-Associated Clean Rooms. *Applied And Environmental Microbiology*, 75 (11), 3484–3491.
- Sudağdan, M., Aydın, A., 2013. Lizozim Ve Nisinin Gıda Kaynaklı *Staphylococcus aureus* Suşlarında Gelişim Ve Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkileri. *İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 39 (2), 254-263.
- Sumathi, V., Reetha, D., 2012. Screening of Lactic Acid Bacteria for Their Antimicrobial Activity against Pathogenic Bacteria. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 3 (4), 802-808.
- Sumeri, I., Arike, L., Adamberg, K., Paalme, T., 2008. Single Bioreactor Gastrointestinal Tract Simulator For Study Of Survival Of Probiotic Bacteria. *Applied Microbiology Biotechnology*, 80, 317–324.
- Sung-Mee, L., Dong-Soon, I., 2009. Screening And Characterization Of Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated From Korean Fermented Foods. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 19 (2), 178–186.
- Syah, S.P., Sumantri, C., Arief, I.I., Taufik, E., 2017. Isolation and Identification of Indigenous Lactic Acid Bacteria by Sequencing the 16S rRNA from Dangke. A Traditional Cheese from Enrekang. South Sulawesi. *Pakistan Journal of Nutrition*, 16 (5), 384-392.
- Şen, E., Özdemir, H., 2016. *Staphylococcus aureus*'un Antibiyotik Dirençliliği Ve Halk Sağlığı Açısından Önemi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 14 (1), 20-35.
- Tebyanian, H., Bakhtiari, A., Karami, A., Kariminik, A., 2017. Antimicrobial Activity Of Some *Lactobacillus* Species Against Intestinal Pathogenic Bacteria. *International Letters Of Natural Sciences*, 65, 10-15.
- Teneva, D., Denkova, R., Goranov, B., Denkova, Z., 2015. Probiotic Properties Of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* Strains Isolated From Salad Dressings. *Scientification Of University Of Food Technologies*, 340-346.
- Tok, E., 2007. Probiyotik Olarak Kullanılabilecek Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Kolesterol Giderimi Özellikleri Ve Safra Tuzu Dekonjugasyonu Etkilerinin Araştırılması. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. Ankara. Türkiye. 95s.
- Tokatlı, M., Gülgör, G., Elmacı, S., Arslanköz, N., Özçelik, F., 2015. *In Vitro* Properties of Potential Probiotic Indigenous Lactic Acid Bacteria Originating from Traditional Pickles. *BioMed Research International*. Article ID 315819. s 8.

- Toma, M.M., Pokrotnieks, J., 2006. Probiotics As Functional Food: Microbiological And Medical Aspects. *Acta Universitatis Latviensis*, 7 (10), 117–129.
- Toure, R., Kheadr, E., Lacroix, C., Moroni, O., Fliss, I., 2003. Production Of Antibacterial Substances By Bifidobacterial Isolates From Infant Stool Active Against *Listeria monocytogenes*. *Journal Of Applied Microbiology*, 95, 1058–1069.
- Tunail, N., 2009. Mikrobiyoloji. Pelin Ofset. Ankara. 488s.
- Tuo, Y., Yu, H., Wu, Z., Guo, B., Chen, W., 2013. Aggregation And Adhesion Properties Of 22 *Lactobacillus* Strains. *Journal of Dairy Science*, 96, 4252–4257.
- Turchi, B., Mancini, S., Fratini, F., Pedonese, F., Nuvoloni, R., Bertelloni, F., Ebani, V., Cerri, D., 2013. Preliminary Evaluation of Probiotic Potential of *Lactobacillus plantarum* strains Isolated from Italian Food Products. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 10, 1913-1922.
- Ulukaya, E. (çeviri ed.) 1997. Biyokimya. 2. Baskıdan çeviri. Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul. Türkiye. 205.
- Uraipan, S., Hongpattarakere, T., 2015. Antagonistic Characteristics Against Food-Borne Pathogenic Bacteria Of Lactic Acid Bacteria And Bifidobacteria Isolated From Feces Of Healthy Thai Infants. *Journal of Microbiology*, 8 (6), 18264.
- Ustaçelebi, Ş., 1999. Temel Ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi. Ankara. 1339 Sayfa.
- Uymaz, B., 2010. Probiyotikler Ve Kullanım Alanları. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 16 (1), 95-104.
- Uzal, F.A., Songer, J.G., 2008. Diagnosis Of *Clostridium perfringens* Intestinal Infections In Sheep And Goats. *Journal Of Veterinary Diagnosis*, 20, 253–265.
- Van Geel-Schutten, G.H., Flesch, F., Brink, B., Smith, M.R., Dijkhuizen, L., 1998. Screening And Characterization Of *Lactobacillus* Strains Producing Large Amounts Of Exopolysaccharides. *Applied Microbiol Biotechnology*, 50, 697-703.
- Varsha, A., Singh, R.B., 2014. Probiotics And Gut Health. *JIMSA*, 27 (1), 41-45.
- Vasiljevic, T., Shah, N.P., 2008. Probiotics-From Metchnikoff To Bioactives. *International Dairy Journal*, 18, 714– 728.
- Venkadesan, D., Sumathi, V., 2015. Screening Of Lactic Acid Bacteria For Their Antibacterial Activity Against Milk Borne Pathogens. *International Journal Of Applied Research*, 1 (11), 970-973.

- Vesterlund, S., Karp, M., Salminen, S., Ouwehand, A.C., 2005. *Staphylococcus aureus* Adheres To Human Intestinal Mucus But Can Be Displaced By Certain Lactic Acid Bacteria. *Microbiology*, 152, 1819–1826.
- Vinderola, C.G., Prosello, W., Ghiberto, D., Reinheimer, J.A., 2000. Viability of Probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and Nonprobiotic Microflora in Argentinian Fresco Cheese. *Journal of Dairy Science*, 83, 1905-1911.
- Walter, J., 2008. Ecological Role Of *Lactobacilli* In The Gastrointestinal Tract: Implications For Fundamental And Biomedical Research. *Applied And Environmental Microbiology*, 74 (16), 4985–4996.
- Wang, J., Zhao, X., Tian, Z., Yang, Y., Yang, Z., 2015. Characterization of an Exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 Isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, 125, 16–25.
- Wang, S.C., Chang, C.K., Chan, S.C., Shieh, J.S., Chiu, C.K., Duh, P., 2014. Effects of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Mustard on Lowering Cholesterol. *Asian Pacific Journal Trop Biomedical*, 4 (7), 523-528.
- Wasko, A., Polak-Berecka, M., Kuzdralski, A., Skrzypek, T., 2014. Variability Of S-Layer Proteins In *Lactobacillus helveticus* Strains. *Anaerobe*, 25, 53-60.
- Wedajo, B., 2015. Lactic Acid Bacteria: Benefits. Selection Criteria And Probiotic Potential In Fermented Food *Journal of Probiotic Health*, 3 (2), 2-9.
- Wickham, M., Faulks, R., Mills C., 2009. In Vitro Digestion Methods For Assessing The Effect Of Food Structure On Allergen Breakdown. *Molecular Nutrition of Food Resources*, 53, 952 – 958.
- Wolupeck, H.L., Morete, C.A., Santa, O.R.D., Luciano F.B., Madeira, H.F., Freitas De Macedo, R.E., 2017. Methods For The Evaluation Of Antibiotic Resistance In *Lactobacillus* Isolated From Fermented Sausages. *Ciência Rural*, 47 (8).
- Xiao, K., 2014. Bile Resistance In *Lactobacillus rhamnosus* GG: Stability and Mechanisms. Master's Thesis University Of Helsinki MBIOT Biotechnology, 72.
- Xie, N., Cui, Y., Yin, Y.N., Zhao, X., Yang, W., Wang, Z, Fu, F., Tang, Y., Wang, X., Liu, X., Wang, C., Lu, F., 2011. Effects Of Two *Lactobacillus* Strains On Lipid Metabolism And Intestinal Microflora In Rats Fed A High-Cholesterol Diet, 11, 53.
- Yadav, A.K., Tyagi, A., Kaushik, J.K., Saklani, A.C., Grover, S., Batish, V.K., 2013. Role Of Surface Layer Collagen Binding Protein From Indigenous *Lactobacillus plantarum* 91 In Adhesion And Its Anti-Adhesion Potential against Gut Pathogen. *Microbiological Research*. 168, 639– 645.

- Yadav, R., Puniya, A.K., Shukla, P., 2016. Probiotic Properties of *Lactobacillus plantarum* RYPR1 from an Indigenous Fermented Beverage Raabadi. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1683.
- Yalçın, S., 2016. Atık Sulardan İzole Edilen *Pseudomonas* spp.' Ların Ekzopolisakkarit Üretimine Bazı Ağır Metallerin Etkisi. Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. 99 Sayfa. Nevşehir.
- Yaşar, B., Kurdaş, O., 2009. Probiyotikler Ve Gastrointestinal Sistem (Probiyotik Teriminin Tarihçesi Ve Tanımı). *Güncel Gastroenteroloji*, 13, 123.
- Yeşilova, Y., Sula, B., Yavuz, E., Uçmak, D., 2010. Probiyotikler. *Kartal Eğitim Ve Araştırma Ve Hastanesi Tıp Dergisi*, (1), 49.
- Yüce, A., 2001. Antimikrobik İlaçlara Direnç Kazanma Mekanizmalar. *Klinik Dergisi*, 14 (2), 41-46.
- Zhang, B., Wang, Y., Tan, Y., Li, Z., Jiao, Z., Huang, Q., 2016. Screening of Probiotic Activities of *Lactobacilli* Strains Isolated from Traditional Tibetan Qula. A Raw Yak Milk Cheese. *Asian Australas. Journal of Animal Science*, 29 (10), 1490-1499.
- Zhao, R., Sun, J., Mo, H., Zhu, Y., 2007. Analysis Of Functional Properties Of *Lactobacillus Acidophilus*. *World Journal of Microbiol Biotechnology*, 23, 195–200.
- Zoetendal, E.G., Vaughan, E.E., Vos, M.W., 2006. A Microbial World Within Us. *Molecular Microbiology*, 59 (6), 1639–1650.
- Zoral, S., 2013. İnsan Kaynaklı *Lactobacillus* spp. Suşlarının Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi. Ahi Evran Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi. Kırşehir. Sayfa 83.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Duygu Alp
Doğum yeri ve Yılı : Kahramanmaraş, 1985
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce-Almanca
e-posta : duygualp1@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Antalya Metin Nuran Çakallıklı Anadolu Lisesi. 2004
Lisans : SDÜ. Mühendislik Mimarlık Fakültesi. Gıda Mühendisliği Bölümü
Yüksek Lisans : Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Bölümü

Mesleki Deneyim

SDÜ Şarkikaraağaç Meslek Yüksek Okulu 2013-2014

Yayınlar

- Alp, D., Bedir, T., Kuleaşan, H., 2018. Viral Hepatitis And Availability In Food. International Health Science And Life Congress 2018. Turkey.
- Bedir, T., Alp, D., Kuleaşan, H., 2018. Antimicrobial Substances Commonly Used In The Food Industry. International Health Science And Life Congress 2018. Turkey.
- Alp, D., Büyüksırt, T., Kuleaşan, H., 2017. Antimicrobial Activity of Some Yeasts and Lactic Acid Bacteria Strains against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* and *Micrococcus* International Congress of Agriculture and Environment. 3rd ASM.
- Alp, D., Büyüksırt, T., Kuleaşan, H., 2017. Antijen-Antikor Kompleksine Dayanan Hızlı Yöntemler Kullanılarak Gıdalarda Bulunan Patojen Mikroorganizmaların Tespit Edilmesi International Congress of Agriculture and Environment. 3rd ASM. Kasım 2017.
- Öner, Z., Dedebaş, T., Alp, D., 2010. Kuşburnu İçeren Yoğurtların Özelliklerinin Belirlenmesi Traditional Foods From Adriatic To Caucasus 2010.
- Alp, D., Ertürkmen, P., 2017. Probiyotik Olarak Kullanılan *Lactobacillus* spp. Suşlarının Kolesterol Düşürücü Etkileri ve Olası Mekanizmalar. MAKÜ FEBED 8(1), 108-113.
- Alp, D., Öner, Z., 2014. Çiğ Sütten İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençlerinin ve Aroma Bileşenlerinin İncelenmesi. GIDA 39 (6), 331-337.

Alp, D., Büyüksırt, T., Kuleaşan, H., 2016. Güneşte Ve Liyofilize Kurutma Yöntemlerinin Domateslerin Bazı Kalite Özellikleri Üzerine Etkileri Türkiye 12. Gıda Kongresi.

Korkut, A., Akçay, S., Alp, D., Kuleaşan, H., 2015. Organik Gıdaların Mikrobiyolojik Değerlendirilmesi. 9. Gıda Mühendisliği Kongresi.

Akçay, S., Alp, D., Korkut, A., Kuleaşan, H., 2015. Gıda Endüstrisinde Vakum Soğutma Teknolojisi. 9. Gıda Mühendisliği Kongresi.

Alp, D., Ertürkmen, P., 2015. Et Ve Et Ürünlerinde *Listeria monocytogenes*'in Bulunma Sıklığı Ve Yarattığı Sorunlar. 9. Gıda Mühendisliği Kongresi.

Ertürkmen, P., Alp, D., 2015. Et İşleme Endüstrisinde Kitosan Kullanımı 9. Gıda Mühendisliği Kongresi 2015.

Alp, D., Özer, Z., 2013. Gıdalarda Bulunan Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençlilikleri 8. Gıda Mühendisliği Kongresi.