

**ANNE SÜTÜ İLE BESLENEN BEBEKLERİN DIŞKISINDAN İZOLE
EDİLEN *LACTOBACILLUS* TÜRLERİNİN BAZI PROBİYOTİK
ÖZELLİKLERİ**

Leila MEHRNIA

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2013

ANKARA

Leila MEHRNIA tarafından hazırlanan ANNE SÜTÜ İLE BESLENEN BEBEKLERİN DIŞKISINDAN İZOLE EDİLEN *LACTOBACILLUS* TÜRLERİNİN BAZI PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİ adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

(Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ)
Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yavuz BEYATLI.....
Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ
Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Ebru YILMAZ
Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Gazi Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 15/ 07 /2013

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Leila MEHRNIA

**ANNE SÜTÜ İLE BESLENEN BEBEKLERİN DIŞKISINDAN İZOLE
EDİLEN *LACTOBACILLUS* TÜRLERİNİN BAZI PROBİYOTİK
ÖZELLİKLERİ
(Yüksek Lisans Tezi)**

Leila MEHRNIA

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Temmuz2013**

ÖZET

Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan, anne sütü ile beslenen yeni doğan bebeklerin dışkisından izole edilen ve 16S rDNA bölgesine göre moleküler tanımlamaları yapılan laktobasil cinsine ait 15 adet bakterinin laktik asit, hidrojen peroksit, ekzopolisakkarit (EPS) üretimleri, antibiyotik duyarlılıkları, antimikrobiyal aktiviteleri, asit direnci, safra toleransı belirlenmiştir. Ayrıca yüksek EPS üretimine sahip olan *Lactobacillus casei* LB74 ve *L. casei* LB61 suşlarının otoagregasyon ve koagregasyon yetenekleri, hidrofobisite, kolesterol giderimleri araştırılmıştır.

Suşların yüzde asit ürettiği miktarının belirlenebilmesi için farklı iki besiyeri kullanılmış ve skim milk besiyerinde daha yüksek asit üretiminin (%1,05-%2,79) olduğu belirlenmiştir. Bakterilerin hidrojen peroksit üretim miktarları 0,68–3,83 µg/mL arasındadeğişirken, ürettiği EPS miktarları 142,99–425,16 mg/L arasında bulunmuştur. Suşların antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının incelenmesinde disk difüzyon metodu kullanılmış ve suşların penisilin G, kloramfenikol ve amoksisiline %100 duyarlı, streptomisin ve vankomisine %100 dirençli olarak belirlenmiştir. Laktobasil suşlarının, bebeklerde hastalığa neden olan patojen bakterilerden *Escherichia coli* ATCC

11229 üzerinde antimikrobiyal etkisinin %93,3, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 üzerinde %73,3, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 üzerinde %86,6, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella typhimurium* MU 80, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 üzerinde ise %100 olduğu belirlenmiştir. Bakterilerin azalan asit ve artan safra konsantrasyonlarında canlılıklarında azalma olduğu ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. EPS üretimi yüksek olan suşların otoagregasyon ve koagregasyon (*E. coli* ATCC 11229, *Salmonella enteritidis* ve *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 suşları ile) yetenekleri incelenmiştir. %otoagregasyon değerleri *L. casei* LB74 (%28,91) suşunda, %koagregasyon değerleri ise *Salmonella enteritidis* test bakterisinin kullanımıyla *L. casei* LB61 (%31,08) suşunda yüksek bulunmuştur. Suşlar, kloroform (%67,05-45,33) ve toluen (%7,88-43,83) ile hidrofobisite göstermişler. Farklı safra konsantrasyonlarında kolesterol gideriminde, suşların artan safra konsantrasyonlarında yüzde kolesterol giderimlerinin arttığını görülmüştür.

Bilim Kodu : 203.1.023

Anahtar Kelimeler : *Lactobacillus* sp., laktik asit, antibiyotik, EPS üretimi, antimikrobiyal aktivite, asit ve safra dirençliliği, agregasyon, hidrofobisite, kolesterol giderimi

Sayfa Adedi : 85

Tez Yöneticisi : Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ

**SOME PROBIOTIC CHARACTERISTICS OF *LACTOBACILLUS* SPECIES
ISOLATED FROM FECES OF INFANTS FED WITH BREAST MILK**

(M.Sc. Thesis)

Leila MEHRNIA

GAZI UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

July 2013

ABSTRACT

In this study, 15 lactobacilli from the Gazi University, Faculty of Science Biotechnology Laboratory culture collection were used as material. The bacteria were formerly isolated from feces of breast-fed newborn babies and were identified based on the 16S rDNA region. The aims of the study were to determine their lactic acid, hydrogen peroxide and exopolysaccharide (EPS) production, antibiotic susceptibility, antimicrobial activity, resistance to acid and bile tolerance. The coagregasyonand autoaggregation capabilities, hydrophobicity, and cholesterol removal of the *Lactobacillus casei*LB74 and *L. casei*LB61 strains that exhibit a high EPS production were also determined.

In order to determine the amount of acid produced by the strains, two different medium were used. Skim milk agar medium provided a higher acid production (1.05%-2.79%). The quantities of hydrogen peroxide production of the bacteria ranged between 0.68-3.83 mg / mL and the quantities of EPS produced rangend between 142.99-425.16 mg/L. Disk diffusion method has been used to determine the sensitivity of the strains to various antibiotics. The strains were 100% sensitive against penicillin G, chloramphenicol, and amoxicillin but 100% resistant against streptomycin and vancomycin. The antimicrobial effect of the lactobacilli strains over the pathogenic bacteria (*Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644,

Salmonella enteritidis ATCC 13076, *Salmonella typhimurium* MU 80, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) that cause disease in infants were %93.3, %66.6, %86.6 and %100, respectively. The bacteria viability decreased at decreasing and increasing bile acid concentrations and the data is statistically significant. Autoaggregation and coaggregation (*E. coli* ATCC 11229, ATCC 7644 strains of *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes*) abilities of the strains with high EPS production were determined. % Autoaggregation value was determined at *L. casei* LB74 (%28.91) and % coaggregation value was determined at *L. casei* LB61 (%31.08) by using the test bacteria *Salmonella enteritidis*. Strains exhibit hydrophobicity with chloroform (67.05 to 45.33%) and toluene (7.88 to 43.83%). Cholesterol removal of the strains also increased with higher bile concentrations.

Science Code : 203.1.023

Key Words: *Lactobacillus* sp., lactic acid, antibiotic, EPS production, antimicrobial activity, resistance to acid and bile tolerance, autoaggregation, hydrophobicity, cholesterol removals

Page Number : 85

Adviser : Assoc. Prof. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde bana yol gösteren ve önemli katkıları olandanışman hocam Sayın Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.Çalışmanın tüm aşamalarında kendisinden çok şey öğrendiğim ve tez çalışmam boyunca bilgisi, deneyimi ve hoşgörüsünü esirgemeyen değerli Sayın Arş. Gör. Betül AYDIN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Bu zamana kadar kendilerinden çok şey öğrendiğim, eğitimim için hiçbir fedakârlıktan kaçmayan ve tez çalışmasının tamamlanmasında desteğiyle yanımda olan bütün aileme, kardeşime ve çalışma boyunca destekleriyle daima yanımda olan tüm dostlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından 05/2012-69 kodlu proje ile desteklenmiştir. Maddi desteklerinden dolayı Gazi Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Probiyotikler	3
2.1.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar.....	5
2.1.2. Probiyotik mikroorganizmaların özellikleri	7
2.1.3. Probiyotiklerin bazı hastalıklardaki iyileştirici etkileri	9
2.1.4. probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalarda aranan özellikler...10	
2.1.5. Probiyotiklerin güvenilirliği	11
2.2. Laktobasiller.....	12
2.3.Laktik Asit ve Üretimi.....	13
2.4. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Üretimi	15
2.5. Antibiyotik Dirençlilik.....	16
2.6. Antimikrobiyal Aktivite.....	17

Sayfa

2.7. Ekzopolisakkarit Üretimi.....	18
2.8. Asit ve Safra Dirençliliği.....	20
2.9. Agregasyon ve Hidrofobisite.....	21
2.10. Kolesterol Giderimi.....	22
3. MATERYAL ve METOT	24
3.1. Materyal.....	24
3.1.1. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve çözeltiler.....	25
3.1.2. Araştırmada kullanılan test bakterileri.....	26
3.2. Metot	27
3.2.1. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları	27
3.2.2. Bakterilerin muhafazası.....	27
3.2.3. Kültürlerin farklı besiyerlerindeki pH ve yüzde asit üretimlerinin belirlenmesi.....	27
3.2.4. Hidrojen Peroksi üretimi.....	28
3.2.5. Antibiyotik duyarlılık.....	30
3.2.6. Antimikrobiyal aktivite	30
3.2.7. Ekzopolisakkarit (EPS) üretimi.....	31
3.2.8. Farklı pH değerlerine tolerans.....	32
3.2.9. Farklı safra konsantrasyonlarına tolerans.....	33
3.2.10. Otoagregasyon.....	34
3.2.11. Koagregasyon.....	34
3.2.12. Hidrofobisite.....	34
3.2.13. Kolesterolgiderimi.....	35

Sayfa	
3.2.14. İstatistiksel analizler.....	37
4. DENEYSEL BULGULAR.....	38
4.1. Kültürlerin Farklı Besiyerlerindeki pH Ve Yüzde Asit Üretimlerinin Belirlenmesi.....	38
4.2. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Üretimi.....	39
4.3. Antibiyotik Duyarlılık	40
4.4. Antimikrobiyal Aktivite.....	43
4.5. Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi	45
4.6. Farklı pH Değerlerine Tolerans.....	46
4.7. Farklı Safra Konsantrasyonlarına Tolerans.....	49
4.8. Otoagregasyon ve Koagregasyon.....	51
4.9. Hidrofobisite.....	52
4.10. Kolesterol Giderimi.....	53
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	56
KAYNAKLAR.....	72
ÖZGEÇMİŞ.....	86

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar.....	6
Çizelge 2.2. Probiyotik olarak kullanılan bakterilerin insan sağlığı üzerindeki Yararlı etkileri.....	8
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan bakteri tür adları ve kodları.....	24
Çizelge 3.2. MRS (Man Rogosa and Sharpe) Sıvı Besiortamı.....	25
Çizelge 3.3. Nutrient sıvı besiyeri.....	26
Çizelge 3.4. Fosfat tamponu.....	26
Çizelge 4.1. Laktobasillerin MRS ve SM besiyerlerindeki pH ve yüzde asitlikler.....	39
Çizelge 4.2. CLSI kriterlerine göre antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi.....	41
Çizelge 4.3. Laktobasil suşlarının antibiyotiklere gösterdiği duyarlılık test sonuçları.....	42
Çizelge 4.4. Laktobasil suşlarının test bakterileri üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çap değerleri (mm).....	44
Çizelge 4.5. Laktobasillerin ekzopolisakkarit üretim miktarları (mg/L).....	46
Çizelge 4.6. Laktobasillerin farklı pH değerlerine toleransı ve regresyon analiz sonuçları.....	48
Çizelge 4.7. Laktobasillerin farklı safra konsantrasyonlarına toleransı ve regresyon analiz sonuçları.....	50
Çizelge 4.8. <i>L. casei</i> LB74 ve <i>L. casei</i> LB61 suşlarının safrasız ve farklı safra konsantrasyonlarında kolesterol giderimleri ve regresyon analiz sonuçları.....	54

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2. 1. Gastrointestinal sistemde bulunan bazı mikroorganizmalar ve sayıları.....	4
Şekil 2. 2. Bağırsak mikroflorasını etkileyen faktörler	5
Şekil 2.3. Bağırsak epitel yüzeyinde probiyotik bakterilerin patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu engellemesi.....	11
Şekil 2.4.L(+) laktik asit ve D(-) laktik asit.....	14
Şekil 2.5. Laktik asit bakterilerinde karbon metabolizması.....	15
Şekil 2.6. <i>L.lactis</i> 'de EPS'nin biyosentetik yolu.....	19
Şekil 3.1. H ₂ O ₂ standart eğrisi.....	29
Şekil 3. 2. EPS standart eğrisi.....	32
Şekil 3. 3. Kolesterol standart eğrisi.....	36
Şekil 4.1. Laktobasillerin hidrojen peroksit üretim miktarları (µg/mL).....	40
Şekil 4.2. Laktobasil suşlarının antibiyotiklere gösterdiği % duyarlılık ve Dirençlilik oranları.....	42
Şekil 4.3. <i>L. casei</i> LB74 ve <i>L. casei</i> LB61 suşlarının %otoagregasyonu.....	51
Şekil 4.4. <i>L. casei</i> LB74 ve <i>L. casei</i> LB61 suşlarının %koagregasyonu.....	52
Şekil 4.5. <i>L. casei</i> LB74 ve <i>L. casei</i> LB61 suşlarının %hidrofobisiteleri.....	53

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2. 1. Laktobasillerin elektron mikroskop görüntüsü.....	12
Resim 4.1. a: <i>L. casei</i> LB61 (1-Siprofloksasin 2-Eritromisin, 3-Gentamisin, 4-treptomisin) b: <i>L. casei</i> LB6 suşlarının antibiyotik duyarlılıkları (Gentamisin, Streptomisin, Amoksili).....	41
Resim 4.2.a: <i>L. casei</i> LB23suşunun b: <i>L. casei</i> LB61suşunun <i>E. coli</i> test bakterisine karşı oluşturduğu inhibisyon zonu	43

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
°C	Santigrat derece
g	Gram
L	Litre
mL	Mililitre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mg	Miligram
mL	Mililitre
M	Molar
nm	Nanometre
pH	Asitlik Bazlık Birimi
spp	Species (Türleri)
%	Yüzde

Kısaltmalar	Açıklama
ATCC	American Type Culture Collection
dk	Dak
dev	Devir
IgA	İmmünoglobulin A
GRAS	Generally Recognized As Safe
EPS	Ekzopolisakkarit
GİS	Gastrointestinal
LAB	Laktik Asit Bakterileri

Kısaltmalar	Açıklama
MRS	Man-Rogosa Sharpe
NE	. Nekrotizan
OD	Optikal Dansite
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
rpm	Devir Sayısı
SM	Skim milk
TCA	Taurokolik as
Vb	Ve diğerleri
OD	Optikal Dansite

1. GİRİŞ

Anne sütü tüm bebekler için özellikle prematürel ve hasta yenidoğanlar için ideal bir besindir. Anne sütünün temiz bir besin olması ve verilirken biberon gibi bir araç gerektirmemesi nedeniyle kontaminasyon riski yoktur [Spear, 2005]. Anne sütü ile beslenen çocuklarda solunum yolları enfeksiyonları, orta kulak iltihabı, üriner sistem enfeksiyonu, menenjit gibi enfeksiyon hastalıkları daha az görülmektedir [Goldman, 1993; Hylander ve ark., 1998]. Yenidoğanlar doğumdan önce plasenta yoluyla ve doğumdan sonra anne sütü ile aldıkları antikolar vasıtasıyla kendi immün sistemleri gelişene kadar enfeksiyonlardan korunurlar [Spear, 2005].

Anne sütü, interlökin, laktoferrin, lizozim, probiyotikler ve Ig-A içeriğine bağlı anti-enfektif özelliklere sahiptir [Kelleher ve Lonnerdal, 2001]. Probiyotikler, bağırsaklardaki mikrobiyal dengeyi düzenleyen canlı mikroorganizmalardır. Probiyotiklerin, laktik asit, asetik asit, bakteriyosin, hidrojen peroksit, ekzopolisakkarit üretimi gibi bazı özellikleri, laktoz intoleransı, alerji riskini azaltılması, serum kolesterol düzeylerinin düşürülmesi, ürogenital enfeksiyonların önlenmesi, kolon kanserini önleme ve bağışıklık sistemi uyarma gibi etkileri olduğu ifade edilmektedir [Nawaz ve ark., 2011; García ve ark., 2012]. Probiyotiklerin bebekler üzerindeki olumlu etkileri arasında rotavirus ishallerinin süresinin kısaltılması, bağırsak florasının gelişimi, allerjik hastalıkların azaltılması, immün modulasyonda ve prematüre bebeklerde nekrotizan enterokolit sıklığının azaltması sayılabilir [Tıraş ve ark., 2010; Tezcan, 2007; Neish, 2009; Bager ve ark., 2008].

Anne sütü ile beslenmenin flora ve immün sistemin gelişmesi üzerine olan yararlı etkileri görüldükten sonra mamaların içeriği anne sütüne benzetilmeye çalışmıştır. Yapılan çalışmalarda mamaların bifidojenitesini artırmak için prebiyotik, probiyotik ve sinbiyotik eklenmesi, düşük proteinli olması ve bazı durumlarda laktozu artırmanın yararlı olduğu vurgulanmaktadır [Aggett ve ark., 2001; Nopchinda ve ark., 2002; Özen, 2004; Scholtens ve ark., 2006].

Bu tez çalışmasında, anne sütü ile beslenen bebeklerin dışkılarından izole edilen laktobasiltürlerinin bazı probiyotik özelliklerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla bu çalışmada, moleküler yöntemlerle tanımlamaları yapılmış bakterilerin laktik asit, hidrojen peroksit ve EPS üretimleri, antimikrobiyal aktiviteleri, antibiyotik duyarlılıkları, asitliğe karşı dirençlilikleri, safra tuzlarına karşı duyarlılıkları belirlenmiştir. Ayrıca, yüksek EPS üretimine sahip iki adet suşun agregasyon-koagregasyon yetenekleri, hidrofobisite ve kolesterol giderim yetenekleri tespit edilmiştir. Tüm çalışmaların sonucunda bazı probiyotik özellikler açısından üstün nitelikli olan insan kaynaklı laktobasil cinsi bakterilerin bulunarak, bu bakterilerin probiyotik olarak kullanılabilirliğinin açığa çıkarılması hedeflenmiştir.

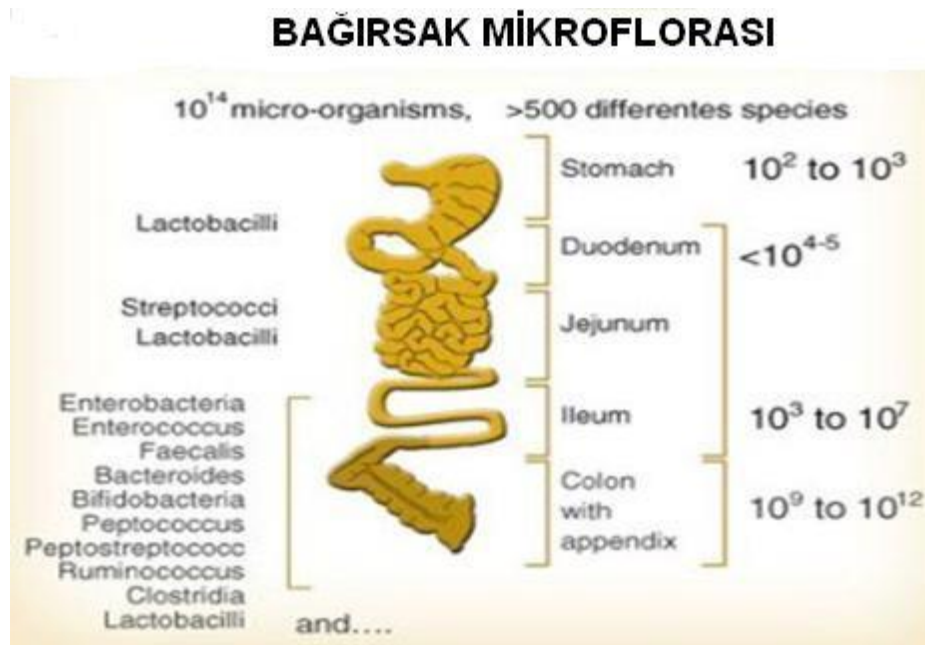
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Probiyotikler

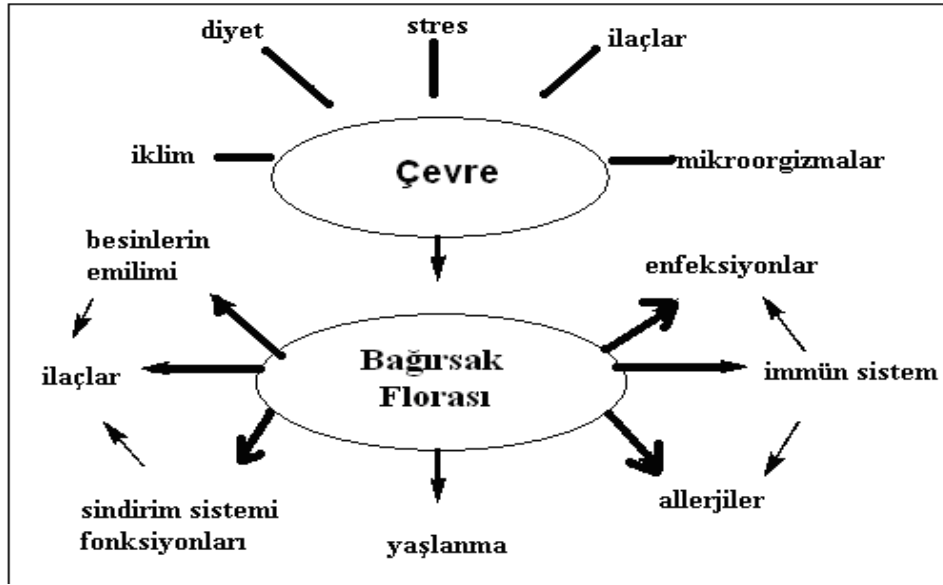
"Probiyotik" terimi, kullanımlarına bağlı olarak ağızda, mide-bağırsak, üst solunum yolu ya da ürogenital kanalda yararlı etkiler yaparak konağın sağlığında iyileşmeye neden olan mikroorganizmalar olarak tarif edilmektedir [Sabir ve ark., 2010; Darılmaz ve ark., 2012]. Doğumda bebeğin bağırsakları steril olmasına rağmen, doğumdan hemen sonra çevrede bulunan mikroorganizmalar ile hızlı bir şekilde kolonize olur. Florayı oluşturacak bakterilerin başlıca kaynakları anne doğum kanalında bulunan mikroorganizmalar ile bebeğin yakın çevresinde ve bu çevrede temas ettiği kişilerde olan mikroorganizmalardır. Doğumdan hemen sonra bağırsak florasında *E. coli* ve streptokoklar baskındır. Bebek anne sütü aldıkça *E. coli*, streptokoklar ve clostridia'lar azalırken, laktobasil ve bifidobakteriler artmaya başlar. Anne sütünden kesildikten sonra erişkin florası yönünde değişiklikler olmaya başlar ve ikinci yılın sonuna doğru erişkin florasının benzeri bir flora oluşur ve yaşam boyu sabit kalır. Mide, duodenum ve jejunumda peristaltizmin daha hızlı olması, asidik ortam (mide) ve safra asitleri (duodenum) nedeni ile daha az sayıda bakteri barındırır (10^{2-3}). İleumdan itibaren geçiş yavaşladığından bakterilerin sayısı (10^{3-7}) ve çeşitliliği kolondakine benzer görünüm kazanmaya başlar (Şekil 2.1). Metabolik olarak aktif olan bu flora diğer bakteriler, mukozal immün sistem ve bağırsak epitel hücreleri ile sürekli iletişim halinde olduğundan bebeğin postnatal gelişimini ve fizyolojisini etkilemesi beklenir [Young ve Huffman, 2003; Caicedo ve ark., 2005; Guarner ve Malagelada, 2003].

Doğumdan sonra florayı oluşturan bakterilerin türü ve miktarına etki eden çok sayıda faktör vardır. Annenin aldığı besinler, probiyotik alıp almaması, doğum şekli (vajinal veya cerrahi), gebelik yaşı ve bebeğin primer beslenme şekli (anne sütü veya mama) gibi ekstrensek faktörler yanısıra yenidoğan bebeğin sağlık durumu, immünolojik durumu, gastrointestinal sistem geçiş zamanı, pH'sı ve stres gibi intrensek faktörler kolonizasyonu etkiler. Doğum kanalından geçemediklerinden sezaryenle doğan bebeklerde flora gelişimi geç olur ve daha çok çevreden alınan mikroorganizmaları

içerir [Caicedo ve ark., 2005]. Yaşamın ilk haftalarında anne sütü ile beslenen bebeklerin bağırsak florasında bifidobakteriler ve laktobasiller baskın iken mama ile beslenen bebeklerin bağırsaklarında enterobakter türleri baskındır. Altı ay dolayında mama ile beslenen bebeklerin florasında laktobasiller ve bifidobakteriler yer almakta ise de anne sütü alanlarıkinden daha azdır ve flora dağılımı oldukça karmaşıktır. Bir yaşında anne sütü ve mama ile beslenen çocukların bağırsak floraları birbirine benzer ve erişkin florasına yakındır [Caicedo ve ark., 2005; Guarner ve Malagelada, 2003]. Gastrointestinal (GİS) florasını çevresel stres, iklim, antibiyotikler, emosyonel faktörler ve diyetel değişiklikler etkileyebilmektedir (Şekil 2.2) [Anonim, 1996].



Şekil 2.1. Gastrointestinal sistemde bulunan bazı mikroorganizmalar ve sayıları [Ceyhan ve Alıç, 2012].



Şekil 2.2. Bağırsak mikroflorasını etkileyen faktörler [Anonim, 1996].

2.1.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar

Farklı cinslere ait birçok mikroorganizma probiyotik olarak kullanılma beraber özellikle laktobasiller ve bifidobakteriler probiyotik olarak kullanılan bakterilerin başında gelmektedir [Fontana ve ark., 2013]. Patojen ve toksik olmayan bu mikroorganizmalar depolama sırasında üründe canlılığını koruduğu ve tüketim sonrası insanların metabolizmasında yer aldığı ölçüde yararı artmaktadır. Bir probiyotik ürün bu mikroorganizmalardan birini ya da birkaçını içerebilir. İçerdiği mikroorganizma sayısı arttıkça probiyotiğin kullanım alanı genişlemektedir [Yılsay ve Kurdal, 2000; Akalın ve ark., 2000]. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar (Prabhu ve ark., 2012; Ceyhan ve Alıç, 2012).

<i>Lactobacillus</i> Türleri	<i>Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus cellebiosus, Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus lactis, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus reuteri, Lactobacillus brevis, Lactobacillus casei, Lactobacillus curvatus, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus johsonli, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus salivarius, Lactobacillus gasseri</i>
<i>Bifidobacterium</i> Türleri	<i>Bifidobacterium adolescentis, Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium breve, Bifidobacterium infantis, Bifidobacterium longum, Bifidobacterium thermophilum</i>
<i>Enterococcus</i> Türleri	<i>Enterococcus faecium, Enterococcus faecalis</i>
<i>Bacillus</i> Türleri	<i>Bacillus subtilis, Bacillus pumilus, Bacillus lentus, Bacillus licheniformis, Bacillus coagulans</i>
<i>Streptococcus</i> Türleri	<i>Streptococcus cremoris, Streptococcus thermophilus, Streptococcus intermedius, Streptococcus lactis, Streptococcus diacetylactis</i>
<i>Pediococcus</i> Türleri	<i>Pediococcus cerevisiae, Pediococcus acidilactici, Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Bacteriodes</i> Türleri	<i>Bacteriodes capillus, Bacteriodes suis, Bacteriodes ruminicola, Bacteriodes amylophilus</i>
<i>Propionibacterium</i> Türleri	<i>Propionibacterium shermanii, Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>Leuconostoc</i> Türleri	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Küfler	<i>Aspergillus niger, Aspergillus oryzae</i>
Mayalar	<i>Saccharomyces cerevisiae, Candida torulopsis, Candida pintolopesii</i>

2.1.2.Probiyotik mikroorganizmaların özellikleri

Patojen mikroorganizmaların sindirim sistemine kolonize ve invaze olmasını engellemek ve konak bağışıklık sistemini uyarmak gibi yararlı etkiler gösteren bu mikroorganizmaların, insanlarda ve hayvanlarda hastalıklardan korunma ve tedavi amacıyla kullanılabilmesi için bazı özelliklere sahip olmaları gerekmektedir. Probiyotiklerin bağırsak fizyolojisi üzerine dolaylı veya doğrudan etkide bulunarak immün sistemi uyardığı ve konakçının ağız ve sindirim sistemi dahil, üst solunum yolu ve ürogenital sistem mukozal yüzeyini etkileyerek iyi hal ve sağlığı geliştirici, hastalık riski azaltıcı potansiyel etkiye sahip olduğu bilinmektedir [Sieladie ve ark, 2011]. Probiyotikler ürettikleri K, B-1, B-2, B-12, folik asit, biyotin, niasin ve piridoksin gibi vitaminler; sindirim enzimleri; sindirim için en uygun pH'yı sağlayan serbest yağ asitleri ile konakta beslenme ve sindirim işlevinde önemli rol alırlar. Probiyotik olarak kullanılan laktik asit bakterilerinin sağlığa yararlı etkileri Çizelge 2.2'de görülmektedir.

Çizelge 2.2. Probiyotik olarak kullanılan bakterilerin insan sağlığı üzerindeki yararlı etkileri [Ceyhan ve Alıç, 2012; Seçkin ve Baladura, 2011].

<u>Yararlı Etki</u>	<u>Etki Mekanizması</u>
Laktöz sindirimine katkı	Bakteriyel laktaz ile laktözün sindirimi
Enterik patojenlere karşı direnç	Bağışıklık salgılama etkisi, kolonizasyon direnci intestinal sistemin patojenleri için uygun olmayan koşullara değişimi (pH, kısa zincirli yağ asitleri ve bakteriyosinler), toksin bağlama bölgelerinin yapısal değişimi, intestinal flora populasyonları üzerindeki etki, intestinal mukozada agregasyon oluşturarak patojenlerin bağlanmasını engelleme, intestinal müsin üretimini düzenleyerek patojenleri epitel hücrelere tutunmasını önlemek
Bağırsak kanserini önleyici etkisi	Mutajenleri bağlama, karsinojenlerin aktivitesini engelleme(inaktif hale getirme) . Bağırsak mikroorganizmalarının ürettiği karsinojen üreten enzimlerin inhibisyonu, bağışıklık sistemini güçlendirme.
İmmün sisteminin düzenlenmesi	Enfeksiyon ve tümör oluşumuna karşı spesifik olmayan savunma mekanizmasını güçlendirir. Antijene özgü immün yanıtta yardımcı etki IgA üretiminin artırılması. Beyaz kan hücrelerinin fagositik aktivitelerinin artırılması.
Alerji	Antijen etkiye sahip maddelerin dolaşım sistemine geçişinin engellenmesi.
Kan lipidleri ve kalp hastalıkları	Kan lipidleri ve kalp hastalıkları
<i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonu	<i>H. pylori</i> inhibitörlerinin (laktik asit, bakteriyosin v.b.) üretimi. <i>H. pylori</i> 'nin üreaz aktivitesinin azaltılması

2.1.3. Probiyotiklerin bazı hastalıklardaki iyileştirici etkileri

Tüm dünyada, probiyotiklerin, nekrotizan enterokolit, rotavirüslerin etken olduğu akut ishaller, antibiyotik kullanımına bağlı gelişen ishaller, vulvo-vajinal kandida enfeksiyonları, turist diyaresi, ülseratif kolit, crohn hastalığı ve periodontal hastalıklar gibi birçok hastalığı iyileştirici etkileri ve kanserlerden korunma amaçlı kullanımlarına ilişkin birçok çalışma devam etmektedir [Resta, 2009]. Bu çalışmaların bebek hastalıklarıyla ilgili en çarpıcı olan iki çalışma aşağıda kısaca belirtilmiştir.

Nekrotizan enterokolit (NE):

NE karın ağrısı, şişlik, kusma, kanlı ishal gibi belirtilerle karakterize olup özellikle yeni doğan döneminde mide bağırsak kanalının en önemli hastalıklarından birisidir. Vakaların önemli kısmını erken doğumlar oluşturmaktadır ve gebelik süresi azaldıkça görülme sıklığı artmaktadır. Normalde laktobasil türleri, doğum kanalından ve emzirme ile anneden yeni doğana geçer. Ancak, sezaryen doğumda ya da erken doğanlarda bu süreç tam olarak gelişmediğinden *Enterococcus faecalis*, streptokoklar, *Staphylococcus epidermidis*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Pseudomonas* gibi patojen mikroorganizmalar bağırsakta kolonize olarak NE gelişmesi için zemin hazırlarlar [Tıraş ve ark., 2010]. Ayrıca mamayla beslenen bebekler, bağırsak floralarında daha az laktobasil ve bifidobakter türleri bulunması sonucu nekrotizan enterokolit gelişimine daha yatkındırlar. Bu konu ile ilgili olarak Kolombiya’da yapılan çarpıcı bir çalışmada $2,5 \times 10^8$ canlı *Lactobacillus acidophilus* ve $2,5 \times 10^8$ *Bifidobacterium infantis* verilen 1237 yeni doğanda nekrotizan enterokolit gelişimi ve buna bağlı mortalitenin %60 oranında azalmış olduğu görülmüştür [Hoyos, 1999].

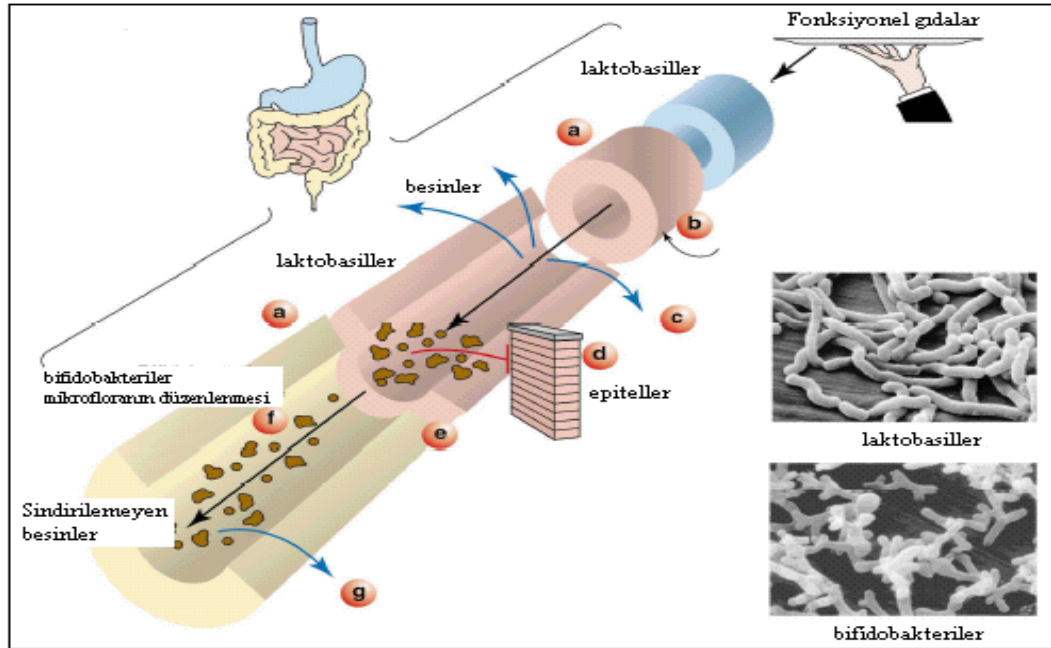
İshal:

Çocuklarda rotavirüs'ün neden olduğu akut ishallerde, *L. rhamnosus* GG ve *B. lactis* BB-12 suşlarının korunmada, *L. reuteri* SD 2222 suşunun ise tedavide yararlı etkileri olduğunu rapor edilmektedir [Pant ve ark., 1996; Szajewska ve ark., 2001].

2.1.4. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalarda aranan özellikler

Probiyotik olarak kullanılacak bir ürünün güvenilir olması, kullanıldığı insan ve hayvanda yan etkisi olmaması, stabil olması, düşük pH ve safra tuzları gibi olumsuz çevre koşullarından etkilenmeden midede canlı kalabilmesi ve bağırsakta metabolize olması, antimikrobiyal patojenik bakterilere antagonist etki göstermesi, maddeler ürerek, antibiyotiklere dirençli olması istenmektedir. Antibiyotiğe bağlı ortaya çıkan hastalıklarda bağırsak florasını düzeltmek amacı ile kullanılabileceklerinden, bağırsaktaki antibiyotiklerden etkilenmemeli ve gıdalara ilave edildiğinde kaliteyi düşürmemelidirler [Kaboreve ark., 2012].

Probiyotik bakterilerin önemli özelliklerinden biri de, bağırsak mukozasına tutunabilme yeteneğine sahip olmalarıdır. Tutunma özelliği en önemli özelliktir ve biyolojik etki gösterebilmeleri için mutlaka olması gereken bir özellik olarak ifade edilmektedir (Şekil 2.3) [Sağdıç ve ark., 2004].



Şekil 2.3. Bağırsak epitel yüzeyinde probiyotik bakterilerin patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu engellemesi[Sağdıç ve ark., 2004].

2.1.5. Probiyotiklerin güvenilirliği

Laktobasil ve bifidobakteriçeren ürünlerin herhangi bir risk taşıdığını gösteren bilgiler mevcut değildir. Probiyotiklere bağlı nadir olarak bildirilen enfeksiyonlar, immün yetmezliği olan ya da altta yatan ciddi hastalığı olan olgularda saptanmaktadır. Çocuklarda probiyotik kullanımı sırasında korkulan en önemli risk septisemidir. Ancak bildirilen septisemi olguları, probiyotik kullanan sağlıklı çocuklarda değil immün sistemi baskılanmış ya da yoğun bakım ünitelerinde ciddi bir hastalık nedeni ile yatan hastalarda ortaya çıkmıştır [Ceyhan ve Alıç, 2012].

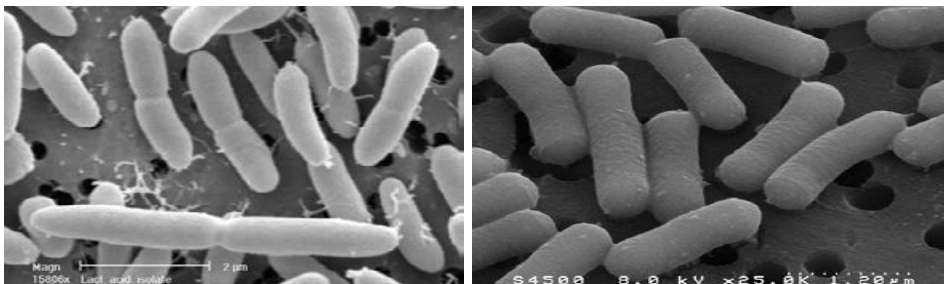
Probiyotik süt ürünleri gelişmiş ülkelerde hızla artan bir şekilde kullanılmaktadır. Ülkemizde de bu tip ürünlerin kullanılmasının genel toplum sağlığı açısından çok önemli yararları vardır. Özellikle çocukluk çağında tüketilmesi yeni nesillerin daha sağlıklı yetişmesine katkıda bulunacağı ifade edilmektedir [Ceyhan ve Alıç, 2012]. *Lactobacillus rhamnosus* bakterisini içeren yoğurt, peynir, fermente içecekler, bebek ve çocuk mamaları gibi ürünlerin üretimi artmaya başlamıştır. Bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde, *Bifidobacterium bifidum* ile birlikte akut ishalin tedavisinde ve

önlenmesinde, antibiyotiğe bağlı ishalin engellenmesinde, kabızlık tedavisinde, diş ve diş eti hastalıklarında, allerjik dermatit/kolit tedavisinde *Lactobacillus rhamnosus* probiyotik bakterisinin kullanımı son yıllarda artmıştır [Canbulat ve Özcan, 2007].

Lactobacillus rhamnosus GG ya da *Lactobacillus* GG bakterisi, bebek ve çocuklar için geliştirilen süt ürünlerinde probiyotik preparatlarında ve gıdaların bileşiminde en yaygın kullanılan laktik asit bakterisidir. Tufts Üniversitesi'nde Sherwood Gorbach ve Barry Goldin adlı bilim insanları tarafından 1983 yılında insan dışkılarından izole edilen *Lactobacillus rhamnosus* GG bakterisi, bu bilim insanlarının soyadlarına ithafen adlandırılmada "GG" eki ile kullanılmaktadır. Bu bakterinin 1985 yılında ise patenti alınmıştır [Silva ve ark., 1987; Saxelin, 1997; Doron ve ark., 2005]. *Lactobacillus rhamnosus* GG ilk defa 1990 yılında yapılan araştırmalarda kullanılmış ve yapılan çalışmalar sonrasında özellikle de çocuk sağlığına olan katkıları sayesinde günümüzde bebek ve çocuk ürünlerinde kullanımı yaygınlaşmıştır [Reid, 2002; Reid ve Burton, 2002].

2.2. Laktobasiller

Yoğurt, peynir gibi fermente süt ürünleri üretiminde laktobasil cinsi bakteriler starter kültür olarak kullanılmaktadır (Resim 2.1). Laktobasiller, asidifikasyon, proteoliz ve aroma oluşumu gibi özelliklere sahiptirler [Seçkin ve Baladura, 2011].



(a)

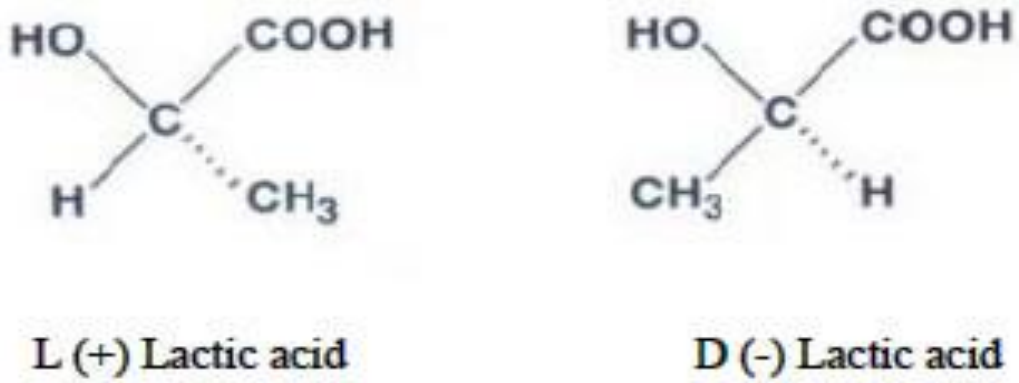
(b)

Resim 2.1. Laktobasillerin elektron mikroskop görüntüsü (a) *Lactobacillus acidophilus*, (b) *Lactobacillus casei* [Ceyhan ve Alıç, 2012].

Laktobasiller, laktozu fermente ederek temelde laktik asit oluşturmalarıyla karakterize, Gram pozitif ve katalaz negatif bakterilerdir. Aerotolerat metabolizmaya sahiptirler. Homofermentatif veya heterofermentatif yolla laktik asit üreten türleri bulunmaktadır. Heterofermentatif olanlar, laktik asitin yanında etil alkol, karbondioksit, asetik asit, format, süksinat oluştururlar [Prasirtsak ve ark., 2013]. Bakteriler, düz ya da hafif kıvrık çubuk şekilli bir morfolojiye sahiptirler. Hücreleri tek tek ya da zincir şeklinde bulunur. Biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri açısından oldukça fazla çeşitlilik içeren üyelerine sahip bir cinstir. Bakterilerinin, gelişebilmeleri için amino asit, peptit, nükleik asit türevi vitamin, tuz, yağ asidi veya yağ asidi esterleri ile fermente edebilecekleri besin maddeleri gerekmektedir [Chen ve ark., 2013]. Bakteriler, diğer mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite gösteren, laktik ve asetik asit gibi organik asitler, H₂O₂, diasetil, alkol, CO₂, bakteriosin veya bakteriosin benzeri metabolitler üretmektedirler [Klaenhammer, 1988; İşleroğlu ve ark., 2008].

2.3. Laktik Asit ve Üretimi

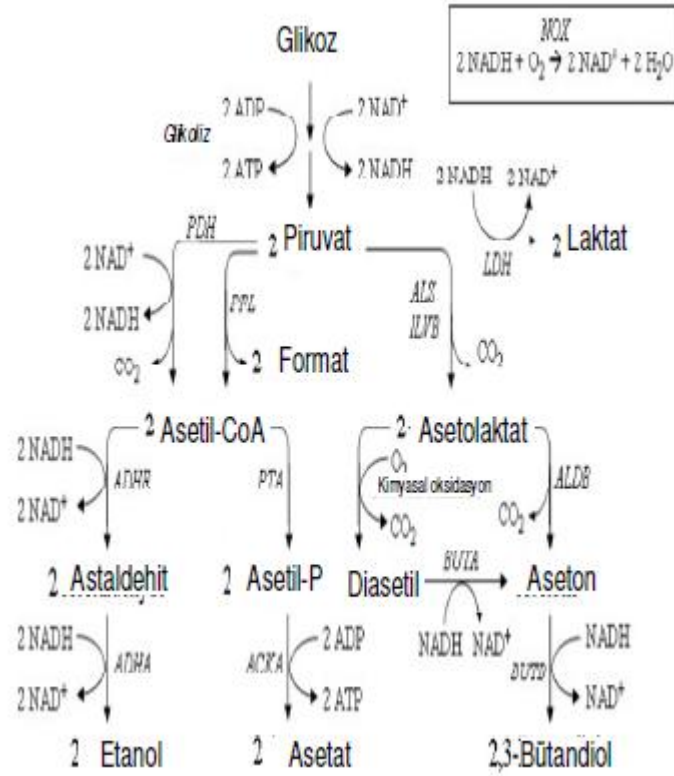
Laktik asit (2- hidroksi propyonik asit), doğada en çok bulunan karboksilik asittir. Kozmetik, ilaç, gıda ve kimya sanayileri gibi bir çok farklı alanda kullanılan önemli bir asittir [Calabia ve Tokiwa, 2007; Oshiro ve ark., 2009; Yenlel ve ark., 2007]. D(-) ve L(+) olmak üzere iki optik izomere sahiptir. D(-) laktik asit, insan metabolizması tarafından metabolize edilemezken, L(+) laktik asit metabolize edilebilmektedir. Laktik asit bakterileri, laktozun bir kısmını L (+), bir kısmını ise D (-) formunda laktik aside dönüştürmektedirler. Fizyolojik olarak L (+) laktik asit, D (-) laktik asit formunda çok daha iyi metabolize edilmektedir (Şekil 2.4). Bundan dolayı özellikle çocukların ve gençlerin beslenmesinde son derece önem kazanmaktadır [Kılıç, 2001].



Şekil 2.4. L (+) laktik asit ve D(-) laktik asit [Narayanan ve ark., 2004].

Laktik asit kokusu olmayan, ekşi tatta olan ve mikroorganizmaları olumsuz etkileyen zayıf bir organik asittir. Mikroorganizmaların membran yapısını bozarak, hücrenin substrat taşıma özelliğini yok etmektedir. [Narayanan ve ark., 2004; Wang, 2010]. Yapılan araştırmalar sonucunda pH'nın düşmesine bağlı antimikrobiyal özelliğe sahip laktik asidin, Gram negatif bakterilerin hücre duvar yapısında bulunan lipopolisakkaritlerin serbest bırakılmasına ve bunun sonucunda dış membranın geçirgen olmasına neden olan bir madde olduğunu ifade edilmektedir [Kılıç, 2001].

Laktik asit, laktobasil cinsi bakteriler tarafından üretilen primer metabolittir. Laktobasiller, ürettikleri laktik asidin neredeyse tamamını enerji kaynağı olarak kullanmaktadırlar [Leroy ve De Vuyst, 2004; Hylckama ve ark., 2007]. Laktik asit fermantasyonu sürecinde oluşan organik asitlerin miktarı ve türü (örneğin; laktik asit, formik asit, vb.) fermantasyon yapan LAB'lerin tür veya suşlarına, kültür içeriğine ve üreme şartlarına göre farklılık göstermektedir (Şekil 2.5) (Hwanhlem ve ark., 2010) .



Şekil 2.5. Laktik asit bakterilerinde karbon metabolizması [Kleerebezem ve Hugenholtz, 2003].

2.4. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Üretimi

H₂O₂, laktik asit bakterileri gibi katalaz negatif mikroorganizmalar tarafından aerop şartlarda üretilmektedir. Ksantin oksidaz, glikoz oksidaz, askorbik asit, sülfidril oksidaz, pirüvat oksidaz, NADH oksidaz ve α -gliserofosfat oksidaz veya laktat oksidaz vasıtası ile katalizlenen reaksiyonda atmosferik oksijenin doğrudan indirgenmesi ile meydana gelmektedir [Juven ve ark., 1991; Wilkins ve Boards, 1989]. H₂O₂'nin hücreler üzerine inhibitör etkisi onun konsantrasyonu ve muamele süresi ile mikrobiyal yük, sıcaklık, pH, inorganik iyonlar, UV veya diğer koruyucularla mikroorganizmaların muamele edilmiş olması gibi faktörlerden etkilenmektedir [Banwart, 1989]. Oluşturulan hidrojen peroksit miktarının laktik asit bakterilerinin cins, tür ve hatta suşlarına göre farklılık gösterdiği ve pek çok mikroorganizma üzerinde inhibitör etkisine sahip olduğu belirlenmiştir [Jara ve ark., 2011].

Hidrojen peroksit termodinamik bakımdan kararsız bir bileşik olup su ve oksijene ayrılmaktadır [Muriana ve Klaenhammer, 1991]. H_2O_2 , reaktif kapasitesinin yüksek oluşu ve hidroksilradikali (OH) gibi sitotoksik oksijen türleri meydana getirmesinden dolayı, çok güçlü bir oksidanttır [Juven ve ark., 1991; Juven ve ark., 1992]. Oksitleyici bir ajan olan H_2O_2 'nin mikroorganizmalar üzerine inhibitör etkisi, metabolik işlemlerde esansiyel olan enzimlerin sülfidril gruplarını etkileyerek disülfid köprüleri oluşturmasına bağlanmaktadır [Nickerson ve Sinskey, 1972; Pendharkar ve ark., 2013]. Araştırmacılar, bazı bakterilerin patojen mikroorganizmaların üremesini kontrol eden çeşitli antimikrobiyal maddeler oluşturduğunu; laktik asit bakterileri tarafından üretilen antimikrobiyal maddelerin intestinal ve üriner sistem enfeksiyonlarında koruyucu rol aldığını bildirmektedirler [Kılıç, 2001; Aslim ve Kilic, 2006].

Rahim kanserinin en büyük nedenlerinden biri olan HPV (Human Papilloma Virus) ile ilgili yapılan bir çalışma sonucunda, hidrojen peroksit konsantrasyonu yüksek olan ortamdaki hücrelerin, kanser hücrelerine dönüşümünün engellendiği, hatta laktik asit bakterilerinin oluşturduğu hidrojen peroksidin kanserli hücreleri tekrar eski haline dönüştürdüğü rapor edilmektedir [Bauer, 2001].

Laktobasil cinsi bakterilerin ürettikleri H_2O_2 den kaynaklanan antimikrobiyal özellikleri, bu bakterilerin gıda sanayinde de sıklıkla kullanılmalarına olanak sağlamaktadır [Turantaş, 2007].

2.5. Antibiyotik Dirençlilik

Probiyotik bakteri seçiminde, antibiyotiklere karşı dirençlilikleri önemli bir seçim kriteri olarak görülmektedir [Yuksekdag ve Aslim, 2010]. Probiyotiklerin özellikle organizmada, gerek sağlıklı bir gelişme gerekse hastalıkların tedavisinde antibiyotiklerin yerine, doğal biyolojik ürünleri destekleyici alternatif ürünler olarak kullanılabilmesi önerilmektedir. Bu sayede mikroflorada stabilite sağlandığı gibi dışarıdan alınan diğer maddelerin (ilaç, antibiyotik vb.) olumsuz etkilerinin de önüne geçilmiş olacağı ifade edilmektedir. Probiyotiklerin yalnızca tedavi amaçlı olmayıp,

tıpta koruyucu amaçlı da kullanılabileceğini, ancak bunun için seçilecek suşların antibiyotiklere ve antifungal ilaçlara dirençli olmasının önemli bir kriter olduğunu rapor edilmektedir [Arroyo ve ark., 2010]. Laktobasiler genelde kloramfenikol, eritromisine duyarlı ve streptomisin, kanamaysin ve neomaysin gibi antibiyotiklere ise dirençli oldukları ve antibiyotiklere olarn dirençliliklerin tür hatta larında farklılık gösterdiği bildirilmektedir [Coppola ve ark., 2005; Zhou ve ark., 2005].

2.6. Antimikrobiyal Aktivite

Laktobasillerin diğer mikroorganizmalara karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivitenin farklı bazı mekanizmalar ile olduğu bilinmektedir. Bunlar:

1. Laktobasillerin karbonhidrat kaynaklarını fermente etmeleri sonucu; laktik ve asetik gibi organik asitler üretilmektedir. Birçok mikroorganizma bu üretilen organik asitlere karşı hassastır ve sonuçta düşen pH'ı da tolere edememektedir.
2. Laktobasiller tarafından aerobik gelişme esnasında üretilen H₂O₂ birçok mikroorganizma üzerine inhibitör etki gösterebilmektedir.
3. Bazı laktobasiller tarafından üretilen ve “bakteriosin ve/veya bakteriosin benzeri metabolitler” olarak isimlendirilen antimikrobiyal karakterli proteinler, özellikle yakın ilişkili bakteriler üzerine inhibitör etki göstermektedir.
4. Bazı laktobasiller tarafından üretilen, diasetil, alkol ve CO₂ gibi metabolitlerde bazı mikroorganizmalar üzerine inhibitör etki gösterebilmektedir [Davidson ve Hoover, 1993].

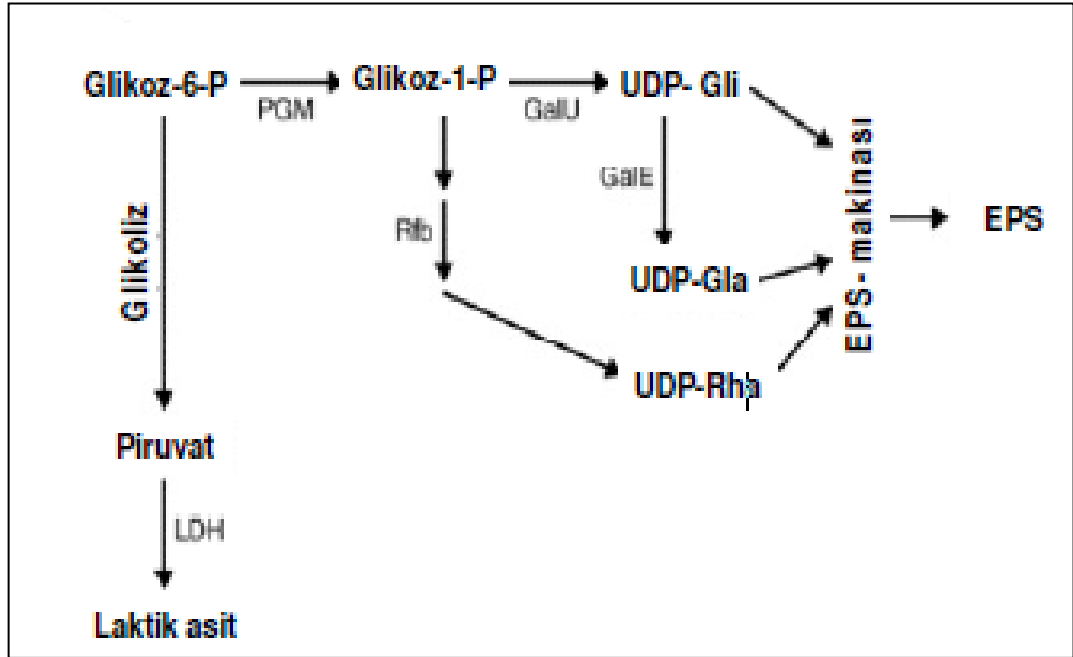
Bağırsak kökenli laktobasillerin antimikrobiyal özelliğe sahip olduğu rapor edilmektedir [Arıcı ve ark., 2004]. Sindirim sisteminde bulunan laktobasiller tarafından üretilen laktik asitten dolayı pH'nın düşmesi, patojen bakteriler üzerinde bakterisidal veya bakteriyostatik etki yapmaktadır. Laktobasiller tarafından üretilen bakteriyosinler, *Staphylococcus aureus* ve *Clostridium perfringens* gibi Gram pozitif

bakterilere karşı, *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli* gibi Gram negatif bakterilerden daha etkili olduğu vurgulanmaktadır. Organik asitlerle beraber ortamda bulunan hidrojen peroksit, bakterilere karşı tek başına laktik asit veya H_2O_2 'den daha etkili olduğu bildirilmektedir [Lankaputhra ve Shah, 1998a; Lankaputhra ve Shah, 1998b].

Bağırsak mikroflorasında bulunan probiyotik bakterilerin çeşitli hastalıklara karşı vücudu koruyucu etkisi bulunduğu bilinmektedir. Son yıllarda çocuklarda artan alerjik hastalıklar, ishal, kabızlık vb. rahatsızlıklar nedeniyle çocuk ürünlerinde probiyotik bakteri kullanımı ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. Önceleri probiyotikler sadece gastrointestinal sistemde bulunan bakterileri dengede tutmak amacı ile kullanılırken, yapılan klinik çalışmalarla farklı yararlarının olduğunu ortaya konulmuştur [Goldin ve Gorbach, 2008]. Yine yapılan araştırmalar sonucunda *Lactobacillus rhamnosus* kültürü içeren yoğurt ile standart yoğurt arasında görünüş, tat, aroma, yapı vb. duyuşal özellikler bakımından bir fark bulunamamıştır [Hekmat ve Reid, 2006].

2.7. Ekzopolisakkarit Üretimi

Ekzopolisakkaritler (EPS) dallanmış tekrarlı şeker birimlerini ve şeker türevlerini içeren uzun zincirli polisakkaritlerdir. Çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilmekte olan bu bileşikler laktik asit grubuna dâhil olan birçok mikroorganizma tarafından üretilmektedir. Şekil 2.6'de *L. lactis*'de EPS'nin biyosentetik yolu gösterilmiştir [Karaca, 2010]. Farklı LAB'den üretilen EPS'lerin kompozisyonları, üç boyutlu yapıları, sertlik, biyokimyasal ve biyofiziksel özellikleri, şeker bağları, polimer uzunluğu, şeker içerikleri, polimer dallanmaları, proteinlerle ilişkileri de birbirinden farklıdır [Kleerebezem ve ark., 2002; Welman ve Maddox, 2003].



Şekil 2.6. *L. lactis*'de EPS'nin biyosentetik yolu [Karaca, 2010].

Bakteriyel polisakkaritlerin varlığı ve rolleri ilk olarak tıbbi incelemelerde ortaya konmuştur. Ancak, EPS'lerin varlığı virulent karakterli bakterilere özgül olmadığı belirlenmiştir. Fiziksel ve kimyasal yoldan ortadan kaldırılan polisakkaritlerin bakteri çoğalmasını etkilemeksizin tekrar oluştuğu bildirilmiştir. Polisakkaritler üretici suşlar tarafından karakterize edilemediklerinden enerji kaynağı olarak da kullanılamazlar [De Vuyst ve Degeest, 1999].

Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen EPS'ler homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadırlar. Homopolisakkaritler bir tip monosakkaritin tekrarlanan birimlerini içermekte olup glukanlar ve fruktanlar olmak üzere 2 büyük gruba ayrılmaktadır. *Leuconostoc mesenteroides* gibi bazı LAB tarafından üretilmektedirler. Heteropolisakkaritler ise oligosakkaritlerin çoklu kopyalarından yapılmış olup her bir tekrarlı birimde iki ya da daha farklı monosakkarit ihtiva etmekte ve *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* gibi birçok LAB tarafından üretilmektedirler [Akinterinwa ve Cirino, 2008].

EPS moleküllerinin, antibiyotiklere ve toksik maddelere karşı hücreleri kurumadan, fagositozdan ve faj etkisinden koruduğu, yüksek oksijen gerilimi sağladığı ve yüzey tutunmasında yapıştırıcı işleve sahip olduğu bilinmektedir [Cerning ve ark., 1992; Fukuda ve ark., 2010]. EPS'lerin immün sistemi desteklediği, antitümoral ve kolesterol düşürücü aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir [Bouzar ve ark., 1996; Welman ve Maddox, 2003].EPS, bağırsak epitel dokusu ile bağırsak florasında bulunan bakteriler arasında bir bağ meydana getirir. Dolayısıyla EPS üretebilen suşlar epitele yüksek kapasitede yapışma özelliğine sahiptirler [Böke, 2005].Kolesterol düşürücü aktivitesinin yanında immün düzenleyiciliği EPS'nin sağlık için yararlı özelliklerinden birkaçıdır [Chabot ve ark., 2001; Makino ve ark., 2006].

EPS'ler gıda sanayinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıdalarda tüketiciler, genel olarak düşük şeker ve yağ içerikli ve az miktarda ek katkı maddesi içeren düşük maliyetli ürünleri tercih etmektedirler. Bu nedenle, LAB'ye ait EPS alternatif olarak görülmüştür. Özel tadı olmayan fermente süt ürünlerinin kıvamlarını, yapılarını iyileştirmek amacıyla kullanılabilmesi bildirilmektedir. EPS aynı zamanda süt ürünlerinin raf ömrünü arttıran bir bileşik olarakta kullanılmaktadır [Kleerebezem ve Hugenholtz, 2003; Kleerebezem ve ark., 2002; Welman ve Maddox, 2003; Kleerebezem ve ark., 1999].

2.8. Asit ve Safra Dirençliliği

Yararlı bağırsak işlevleri olan probiyotik bakterilerin midenin asidik ortamından geçerken hayatta kalması gerekmektedir. Sağlıklı insanlarda beslenme ile değişmekle beraber, mide pH'ı yaklaşık 2-2,5'dir. Laktobasiller, mide asitliğine, safra tuzuna ve lizozim enzimine diğer bakterilere göre daha dayanıklıdır. *Lactobacillus acidophilus* ve *L. gasseri* asidik şartlar altında en az 90 dakika canlı kalabildiği belirtilmektedir. Bu süre de bağırsaktaki aktif yere ulaşması için yeterli bir süredir [Huang ve Adams, 2004].

Laktik asit bakterilerinin karbonhidrat kaynaklarını fermente etmeleri sonucu; laktik ve asetik gibi organik asitler üretilmektedir. Bu özellik, probiyotik organizmaların en önemli seçim kriterlerinden biri olan, pH'nın 1,5'e kadar düşebildiği midede ve asidik ürünlerde bakterilerin canlı kalabilme kabiliyeti kazandırmaktadır [Shah, 2001]. Probiyotik bakterilerin karşısındaki bir diğer engelde safra tuzları ve pankreatin içeren ince bağırsak sisteminde hayatta kalabilmeleridir [Huang ve Adams, 2004]. İstenilen, probiyotik organizmaların bağırsakta bulunması ve mide asitliğinde canlı kalabilmesidir [Shah, 2001]. Safra, bakterilerin büyük oranda lipit ve yağ asidi içeren hücre membranına zarar vererek antimikrobiyal etkiye sahiptir [Darılmaz ve Beyatlı, 2011b].

2.9. Agregasyon ve Hidrofobisite

Laktobasillerin mide-bağırsak yolunda yaşama düzeylerini ve kolonize olmalarını arttırıp, yüzeye ve birbirlerine yapışarak biyolojik bir bariyer oluşturmalarını sağlayan agregasyon, toplanma, bir araya gelme, kümeleşme anlamına gelmektedir. Agregasyon, aynı türe ait mikroorganizmaların birbirlerine tutunması olarak ifade edilen otoagregasyon ve farklı türe ait iki mikroorganizmanın birbirine tutunması olarak ifade edilen koagregasyon olmak üzere iki şekilde meydana gelmektedir. Koagregasyonun, patojenlerin doku reseptörlerine girişini engelleyen ve laktobasillerin ortamda bulunması ile patojenlerin epitel hücrelere tutunmasını önlemede alternatif olduğu düşünülmektedir [Tuo ve ark., 2013]. Koagregasyonda probiyotik bakteriler, patojenlere yapışarak patojen mikroorganizmaların gelişimlerini önler. Laktobasil türleri koagregasyon özellikleri ile patojenlerin kolonizasyonunu önlediği rapor edilmiştir [Schachtsiek ve ark., 2004]. Bakterilerin agregasyon ve koagregasyon özelliklerine sahip olması, bulunduğu hücrelere tutunma ve dominant olarak kolonize olmasını sağlayacağından özellikle probiyotik açıdan önemli bir kriterdir [Vlkova ve ark., 2008].

Bakterilerin farklı maddelere tutunmasında öncelikle hücre yüzeyinin fizikokimyasal özellikleri etkili olmaktadır. Ayrıca, hücre tutunması ile pozitif ilişkisi olan hidrofobisite, hemaglutinasyon gibi karakterlerle de hücre yüzeyinin fizikokimyasal

özelliklerini belirlenmesinde kullanılabileceği belirtilmektedir. Streptokoklar, laktobasiller ve bifidobakterilerin hücre tutunması ile hücre yüzey hidrofobisitesi arasında pozitif bir ilişki olduğu gözlemlenmiştir [Jara ve ark., 2011]. Agregasyon ile hidrofobisite arasında doğrudan bir ilişki olmadığına rağmen epitel yüzeye tutunmada agregasyon ile beraber hidrofobisitenin de gerekli olduğu, belirlenmektedir [Schachtsiek ve ark., 2004].

2.10. Kolesterol Giderimi

Kolesterol insanlardaki en yaygın steroldür ve vücutta belirli sayıda, bir grup işleve sahiptir. Bütün hücre zarlarının bir bileşenidir ve safra tuzları, steroid hormonlar ve D vitamininin öncül maddesidir. Kolesterol, yiyeceklerden alınır veya vücut tarafından sentezlenir. Kolesterol daha ziyade, feçesle atılarak safra asitlerine dönüşür veya safra içine salgılanarak, atılmak üzere bağırsağa taşınır. Bağırsaktaki kolesterolün bir kısmı atılmadan önce bağırsaktaki bakteriler tarafından değiştirilir. Bu şekilde oluşan başlıca bileşikler, kolesterolün indirgenmiş türevleri olan koprostanol ve kolestanoldür. Bu üç bileşik (kolesterol, koprostanol ve kolestanol) nötral dışkı sterollerini oluştururlar [Champ ve Harvey, 1997].

Kolesterol tüm vücut dokularına gerekli olmasına rağmen, kanda bulunan yüksek seviyede kolesterol, koroner kalp hastalığının neden olabilir. Kan kolesterol seviyelerini düşürmek için uygulanan en son tedavi yöntemleri arasında, perhiz uygulaması, düzenli egzersiz ve ilaç tedavisi yer almaktadır [Jones ve ark., 2004]. Kandaki yüksek kolesterol seviyelerinin düşürülmesi için perhiz uygulamalarında yeni yaklaşım olarak probiyotik bakterilerin kullanımı önerilmektedir [Nguyen ve ark., 2007]. Laktik asit bakterilerinin kolesterol düşürücü fonksiyonunun mekanizmasının safra tuzu hidrolaz (BSH) enzim aktivitesi ile safra tuzlarının dekonjuge etmesi, dekonjuge safra tuzları ile kolesterolün presipite edilmesi, kolesterolün hücre yüzeyine tutunması ve kolesterolün farklı bir form olan koprostanole çevrilmesi olduğu ifade edilmektedir [Corzo ve Gilliland, 1999].

Bağırsak mikroorganizmaları tarafından safra tuzlarının dekonjugasyona uğraması,

serum kolesterol seviyelerinin düşürülmesi bakımından çok önemlidir [Corzo ve Gilliland, 1999]. Safra tuzları ince barsağa besinlerle alınan yağların, kolesterolün, hidrofobik vitaminlerin ve yağda çözünen diğer bileşiklerin emiliminde yardımcı olmak üzere yayılırlar. Safra tuzlarının %97'si ince bağırsakta geri emilerek enterohepatik döngü ile karaciğere geri döner. Safra tuzlarının çok az bir kısmı ise geri emilmeyerek, serbest safra asitleri şeklinde feçes vasıtasıyla vucuttan atılır [Tanaka ve ark, 1999].

Safra asitlerinin dekonjugasyonunun, kolesterolün bağırsak kanalından daha az emilmesine yol açtığı, enterohepatik döngüyle karaciğere dönen safra asidi miktarını azaltarak, karaciğerdeki safra asidi üretimini artırdığı, bağırsaklarda meydana gelen asidik ortamda kolesterolün serbest safra asitleriyle çökmesini sağlamak suretiyle serum kolesterol seviyelerinin azalmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir [Corzo ve Gilliland, 1999].

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

Araştırma, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan, anne sütü ile beslenen yeni doğan bebeklerin dışkılarından izole edilen ve 16S rDNA bölgesine göre moleküler tanımlamaları yapılan laktobasil cinsine ait 15 adet bakteri ile yürütülmüştür. Çalışmada kullanılan bakteriler Çizelge 3.1 gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan bakteri tür adları ve kodları

Tür ismi	KoduBakteri
<i>Lactobacillus casei</i>	LB17
<i>Lactobacillus casei</i>	LB19
<i>Lactobacillus casei</i>	LB74
<i>Lactobacillus casei</i>	LB61
<i>Lactobacillus casei</i>	LB64
<i>Lactobacillus casei</i>	LB83
<i>Lactobacillus casei</i>	LB68
<i>Lactobacillus casei</i>	LB65
<i>Lactobacillus casei</i>	LE4
<i>Lactobacillus casei</i>	LB49
<i>Lactobacillus casei</i>	LB23
<i>Lactobacillus casei</i>	LE7
<i>Lactobacillus casei</i>	LB6
<i>Lactobacillus brevis</i>	LB63
<i>Lactobacillus fermentum</i>	LB16

3.1.1. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve çözeltiler

Ekzopolisakkarit (EPS), hidrojen peroksit üretimleri, antibiyotik duyarlılıkları, asit direnci, safra toleransı, otoagregasyon-koagregasyon, hidrofobisite ve kolesterol giderimi çalışmalarında bakterileri kültürlerini geliştirmek için MRS (Man Rogosa and Sharpe, Çizelge 3.2) sıvı besiyeri, antimikrobiyal aktivite ve koagregasyon çalışmalarında patojen mikroorganizma kültürlerini geliştirmek için ise nutrient sıvı besiyeri (Çizelge 3.3) kullanılmıştır. Bakterilerin laktik asit üretimlerinin belirlenmesinde MRS ve %10'luk skimmilk besiyerleri olmak üzere iki farklı besi yeri kullanılmıştır [De Man ve ark., 1960].

Çizelge 3.2. MRS [Man Rogosa and Sharpe] Sıvı Besiortamı

Maddeler	Miktar (g/L)
Pepton	10,00
Beef Eksrakt	10,00
Yeast Ekstrakt	5,00
Glikoz	20,00
K ₂ HPO ₄	2,00
Sodyum Asetat.3 H ₂ O	5,00
Tri Amoniyum Sitrat	2,00
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,20
MnSO ₄ .4 H ₂ O	0,05
Tween 80	1,08 mL

MRS besiyerleri için maddeler tartılarak distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmış ve 1 M HCl ve 1 M NaOH ile pH 6,2'ye ayarlanarak otoklavda 121°C'de 15 dak steril edilmiştir [Halkman, 2005].

Çizelge 3.3. Nutrient sıvı besiyeri

Maddeler	Miktar (g/L)
Beef Ekstrakt	1
Yeast Ekstrakt	2
Pepton	5
Sodyum Klorit	5

Nutrient sıvı besiyeri için maddeler tartılarak distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmış ve besi ortamının pH'sı 1 M HCl ve 1 M NaOH'le 6,8'ye ayarlanmıştır. Katı besiyeri hazırlamak için besiyerine %1,5 oranında agar (Merck) eklenmiştir. Otoklavda 121°C'de 15 dak steril edilmiştir [Halkman, 2005].

Çalışmalarda kullanılan fosfat tamponu için Çizelge 3.4'da verilen maddeler tartılarak distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır. pH'sı 1 M HCl ve 1 M NaOH'le 7,0'ye ayarlandıktan sonra otoklavda 121 °C'de 15 dak steril edilmiştir.

Çizelge 3.4. Fosfat tamponu

Maddeler	Miktar (g/L)
NaCl	8,00
K ₂ HPO ₄	1,21
KH ₂ PO ₄	0,34

Hidrojen peroksit çalışmalarında kullanılan 0,1 M Asetat tamponu için 13,608 g sodyum asetat tartılarak distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmış ve 1 M HCl ve 1 M NaOH kullanılarak pH sı 4,5' e ayarlanmıştır.

3.1.2. Araştırmada kullanılan test bakterileri

Çalışmada test bakterileri olarak *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Salmonella typhimurium* MU80 kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları

Laktobasil bakteri kültürleri MRS besiyerine %2 oranında aşılandıktan sonra 37°C'de aerobik koşullarda 16–18 saat geliştirilmiştir. Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kullanılan patojen mikroorganizmalar nutrient besiyeri içerisinde 37°C'de 24 saat geliştirilmiştir. Yapılan tüm çalışmalarda iki kez aktifleştirilmiş kültürler kullanılmıştır.

3.2.2. Bakterilerin muhafazası

Bakterilerin muhafazası için 1,5 mL'lik ağzı kapaklı tüplere 0,4 mL gliserol konularak, 121°C'de 15 dak otoklavda steril edilmiştir. Bakteriler MRS sıvı besi ortamında iki kez ardı ardına aktifleştirilmiştir. Aktifleştirilen kültürlerden 0,6 mL gliserol içeren steril ağzı kapaklı tüplere ilave edilerek, -80°C ve -20°C'de paralelli olarak muhafaza edilmiştir. Muhafazaya alınan stoklar iki ayda bir yenilenmiştir [Okereke ve Montville, 1991].

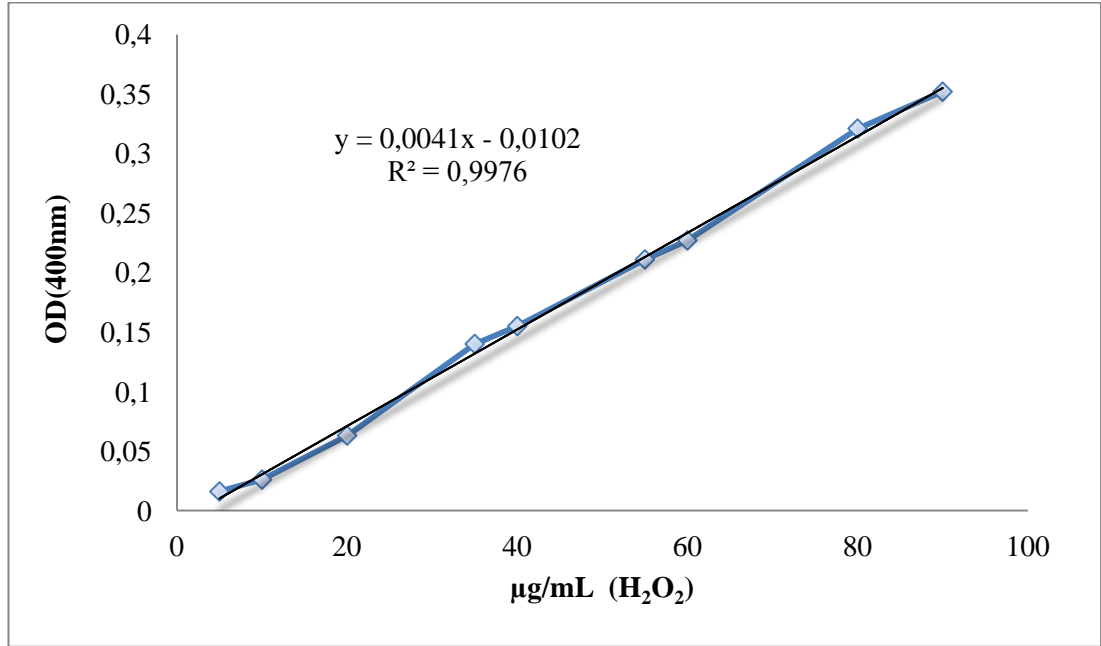
3.2.3. Kültürlerin farklı besiyerlerindeki pH ve yüzde asit üretimlerinin belirlenmesi

Aktif laktobasil bakterisi kültürleri skimmilk (SM) ve MRS sıvı besi yerlerine %2 oranında aşılanmış ve inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kültür besiyerinin pH değerleri Metler Toledo marka pH metre ile ölçülmüştür. pH değerleri ölçülen 10 mL'lik kültür, distile suyla 100 mL'ye tamamlanmıştır. 250 mL cam erlene aktarılan karışım üzerine 2-3 damla fenol fitaleyn renk indikatörü damlatılarak 0,1 M NaOH (Merck) çözeltisi ile titre edilmiştir. Harcanan NaOH miktarına bakterilerin ürettiği asit titre edilebilir yüzde asitlik olarak hesaplanmıştır [Demirci ve Gündüz, 1994].

3.2.4. Hidrojen peroksit üretimi

Laktobasil bakteri kültürlerinin hidrojen peroksit üretimi Gilliland [1969]'ın metoduna göre spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Aktif suşlardan 10 mL'lik MRS sıvı besiyeri %2 oranında inoküle edilerek, 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örneklerin pH'sı 1 M HCl ile 4,5'e ayarlanmıştır. 0,1 M Asetat tamponundan 2 mL eklenmiş ve 20 mL distile su ile seyreltilmiştir. Örnekler 5000 rpm'de 10 dak santrifüj edilerek, Whatman 42 no'lu filtre kağıdı ile süzümüştür. Süzülen sıvıdan 5 mL alınarak 1 mL distile su içeren tüpe konulmuş ve 0,1 mL o-dianisidin ilave edilmiştir. Bir başka tüpe de süzülen sıvıdan 5 mL alınarak üzerine 1 mL horseradish peroksidaz, 0,1 mL o-dianisidin solüsyonları konulmuştur. Tüpler iyice karıştırılarak oda sıcaklığında 10 dak bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında 0,2 mL 4 M HCl ile reaksiyon durdurularak renk sabitlenmiştir. HCl eklenmesinden 5 dak sonra her bir örneğin 400 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Digilab Hitachi U-1800) ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar standart eğri ile karşılaştırılarak, hidrojen peroksit miktarları µg/mL olarak saptanmıştır.

Standardın hazırlanması; 0,01 M asetat tamponun (pH 4,5) içinde mL'de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 µg H₂O₂ içeren 10 mL'lik çözeltiler hazırlanmıştır. 5 mL'lik hazırlanan her bir çözeltinin üzerine 1 mL horseradish peroksidaz, 0,1 mL o-dianisidin solüsyonu ilave edilmiştir. Körv olarak; 5 mL 0,01 M asetat tamponu, 1 mL horseradish peroksidaz, 0,1 mL o-dianisidin solüsyonları kullanılmıştır. Tüpler iyice karıştırılarak oda sıcaklığında 10 dak bekletilmiş ve 0,2 mL 4 M HCl (5 dak bekletilmiştir) ile reaksiyon durdurularak renk sabitlenmiştir. Her bir standardın 400 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçümleri gerçekleştirilerek hidrojen peroksit standart kurve çıkarılmıştır. Standart kurve den 1 µg/mL hidrojen peroksit tekabül eden hidrojen peroksit hesaplanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. H₂O₂ standart eğrisi

Kullanılan Çözeltiler:

Horseradish Peroksidaz Solüsyonu

Distile Su 1 mL

Horseradish Peroksidaz 1 mg

Horseradish peroksidaz solüsyonu 1: 100 oranında distile suda seyreltilerek kullanılmıştır.

O-dianisidin Solüsyonu

%1'lik O-dianisidin solüsyonu metanol'de hazırlanmıştır.

0,01 M Asetat Tamponu

1: 100 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.

3.2.5. Antibiyotik duyarlılık

Çalışmada, klinikte bebeklerin tedavilerinde yaygın olarak kullanılan antibiyotikler kullanılmıştır. Suşların antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir [Warminska ve ark., 2002]. Bakterilerin penisilin (10 unit), amoksisilin (30 µg), vankomisin (30 mcg), azitromisin (15 µg), teikoplanin (30 µg), eritromisin (15 µg), streptomisin (10 µg), gentamisin (10 µg), kloramfenikol (30 µg), siprofloksasin (5 µg) antibiyotiklerine duyarlılıkları test edilmiştir. İzole edilen laktobasiller, 37°C'de iki kez ard arda aktifleştirilmiştir. Steril sisteinli MRS katı besiyerinden sterilpetri kaplarına 20 mL konulmuş ve donması için oda sıcaklığında bekletilmiştir. 0,5 Mac Farland bulanıklılığına eşdeğer olarak ayarlanan aktif kültürlerden, donan besiyerine üzerine 100 µL aktarılmış ve steril drigalski ile besiyerine üzerine homojen bir şekilde yayılmıştır. Antibiyotik diskleri, petri kutusunun kenarından 10 mm ve birbirinden 15 mm uzaklıkta olacak şekilde steril olarak besiyerinin üzerine yerleştirilmiş ve 37°C'de 18–24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda antibiyotik disk çevresinde oluşan zonların çapı kumpas ile milimetrik olarak ölçülmüştür. Sonuçlar Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute) kriterlerine değerlendirilmiştir [CLSI, 2011].

3.2.6. Antimikrobiyal aktivite

Çalışmada kullanılan laktobasilsuşlarının antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesinde kuyu difüzyon yöntemi kullanılmıştır [Reinheimer ve ark., 1990; Gonzalez ve ark., 2007]. Bakteriler 37°C'de iki kez ard arda aktifleştirilmiştir. 10⁵ kob/mL'lik aktif kültürler 5000 rpm'de 15 dak santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan berrak kısım (süpernatant) steril şartlar altında 0,45 µm'lik disposable filtre ile mikrofiltrasyon yolu ile sterilize edilmiştir. Test bakterileri (*Escherichia coli* ATCC11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella typhimurium* MU80 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) Nutrient sıvı besiyerinde 24 saat uygun sıcaklıklarda aktifleştirilip, aktif kültürlerin hücre yoğunlukları 0,5 Mac Farland

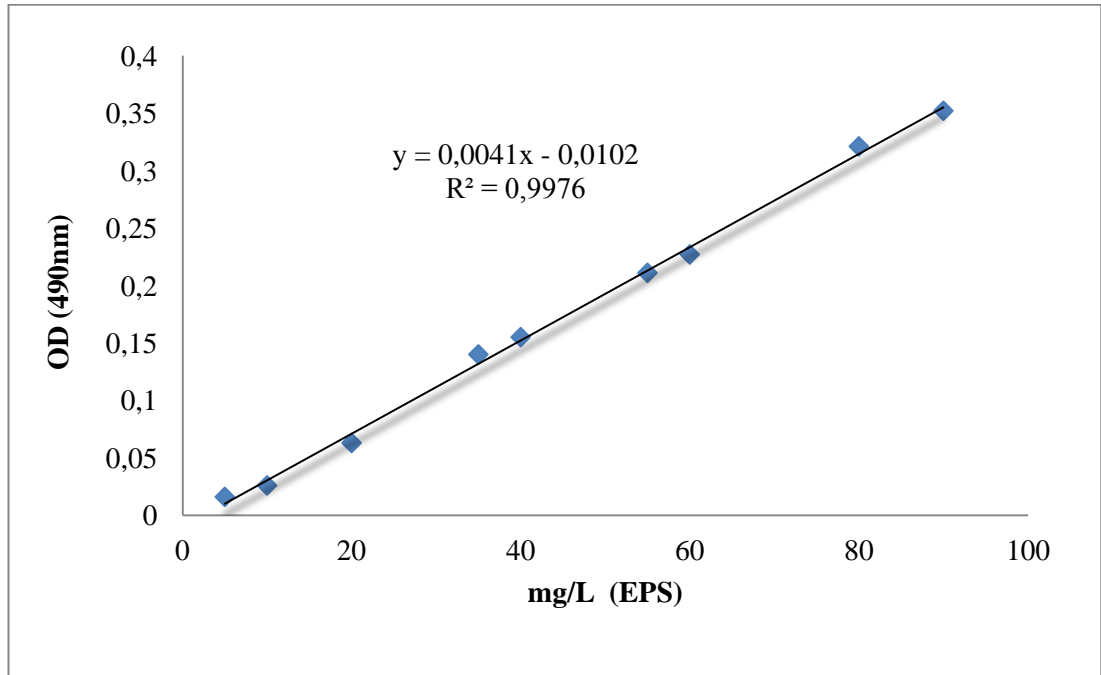
standardına göre ayarlanmıştır. Aktif laktobasil kültürlerinden steril petri kabı üzerine 100 µL aktarılmıştır. Bu işlemde sonra daha önceden hazırlanıp 121°C’de 15 dak otoklavda steril edilen ve yaklaşık olarak 50°C’ye kadar soğutulan Nutrient katı besiyeriden her petri kabına 20 mL ilave edilmiştir. Daha sonra, besi ortamı ve petri kabı zeminine inoküle edilen test bakterilerinin homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. Homojenlik sağlandıktan sonra petri kabı içerisindeki Nutrient katı besiyerinin donması için 2 saat buzdolabında bekletilmiştir. Donan katı besiyeri üzerinde 6 mm çapındaki steril çubukla kuyular açılarak, kuyuların tabanları steril agarla sıvanmıştır. Bu kuyulara laktobasil suşlarının süpernatantından 100 µL ilave edilmiş ve 37°C’ de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyu çevresinde oluşan zonların çapı kumpas ile ölçülmüştür ve çap ölçümleri milimetrik olarak verilmiştir.

3.2.7. Ekzopolisakkarit (EPS) üretimi

Laktobasiler, 37°C’de iki kez ard arda MRS sıvı besi ortamındaaktifleştirilmiştir. Aktif kültürlerin optikal yoğunlukları spektrofotometrede (Digilab Hitachi U-1800) 600 nm dalga boyunda 0,600’e ayarlanmıştır. OD değerleri ayarlanan bakterilerden 5 mL’lik MRS sıvı besi ortamlarına ikişer paralelli olarak %2 oranında inoküle edilerek, 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürlerden 1 mL ependorf tüplerine alınarak, 100°C’de 15 dak kaynatılmıştır. Örnekler oda sıcaklığına geldikten sonra üzerine %0,17 oranında %85’lik Trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi eklenmiş ve 13,000 rpm’de 25 dak santrifüj edilmiştir. Süpernatant temiz bir ependorf tüpüne alınarak üzerine eşit hacimde etanol eklenerek 15 dak 13,000 rpm’de santrifüj edilmiş ve EPS’nin presipite olması sağlanmıştır. Pelletler 1 mL steril distile suda çözüldükten sonra üretilen EPS miktarının tayini için fenol sülfürik asit metodu uygulanmıştır [Torino ve ark., 2001].

Fenol sülfirik asit metodu:

Örneklerin üzerine 0,5 mL fenol (Sigma) ve 5 mL sülfirik asit (Merck) hızlı bir şekilde eklenerek oda sıcaklığında 10 dak beletildikten sonra iyice karıştırılarak 30°C’de 20 dak beletilmiştir. Örneklerin optik yoğunlukları 490 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Kùltürlerin ürettiği EPS miktarlarını hesaplamak için 5-100 mg/L arasında değişen oranlarda glikoz (Merck) çözeltilisi kullanılarak standart çıkarılmış ve bu standarda göre üretilen EPS miktarı mg/L cinsinden belirlenmiştir (Şekil 3.2) [Dubois ve ark., 1956].



Şekil 3.2. EPS standart eğrisi

3.2.8. Farklı pH değerlerine tolerans

Suşlarının asit dirençlilikleri Chung ve ark [1999]’nın metoduna göre belirlenmiştir. 37°C’de iki kez ard arda MRS sıvı besi ortamında aktifleştirilen kùltürlerin optikal yoğunlukları spektrofotometrede (Digilab Hitachi U-1800) (600 nm) 0,600’e ayarlanmıştır. OD değerleri ayarlanan bakterilerden %2 oranında, pH’sı 4 M HCl (Merck) ile 2, 3, 4 ve 5’e ayarlanan MRS sıvı besiyerlerine inoküle edilerek 37°C’de

inkübe edilmiştir. Hücre gelişimi 24 saat sonrasında spektrofotometrede (Digilab Hitachi U-1800) 600 nm de ölçülmüştür. Elde edilen OD değerleri kontrol grubu (pH'sı 6,2 olan MRS sıvı besiyerinde gelişen kültürün yoğunluğu) ile karşılaştırılarak farklı pH değerlerinin suşlar üzerindeki yüzde canlılık değeri hesaplanmıştır.

%Canlılık: $OD_1/OD_2 \times 100$

OD₁: Bakterilerin farklı pH ortamlarındaki yoğunlukları

OD₂: Kontrol

3.2.9. Farklı safra konsantrasyonlarına tolerans

37°C'de iki kez ard arda MRS sıvı besi ortamında aktifleştirilen laktobasil kültürlerinin optikal yoğunlukları spektrofotometrede (Digilab Hitachi U-1800) 600 nm'de 0,600'e ayarlanmıştır. OD değerleri ayarlanan bakterilerden %2 oranında, %0 (kontrol), %0,06, 0,15 ve 0,30 oranlarında safra (Sigma) içeren MRS sıvı besiyerlerine inoküle edilerek 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Hücre gelişimi 24 saat sonrasında spektrofotometrede (Digilab Hitachi U-1800) 600 nm de ölçülmüştür. Elde edilen OD değerleri kontrol grubu (safra içermeyen MRS sıvı besiyerinde gelişen kültürün yoğunluğu) ile karşılaştırılarak farklı safra konsantrasyonlarının suşlar üzerindeki yüzde canlılık değerleri hesaplanmıştır [Chung ve ark., 1999].

%Canlılık: $OD_1/OD_2 \times 100$

OD₁: Bakterilerin farklı safra ortamlarındaki yoğunlukları

OD₂: Kontrol

3.2.10. Otoagregasyon

Otoagregasyon yeteneklerinin belirlenmesinde EPS üretimleri yüksek olan *Lactobacillus casei* LB74 ve *L. casei* LB61 suşları kullanılmıştır. Bakteriler MRS sıvı besiyerinde 37°C'de 18-20 saat aktifleştirilmiştir. Aktif kültürler 10 000 rpm'de 15 dak santrifüj edilmiştir. Elde edilen pellet, iki defa fosfat tamponu (PBS) ile yıkanmış ve pellet yine PBS içerisinde süspansiyon edilmiştir. Yıkanan kültürlerin optik yoğunlukları 600 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Digilab Hitachi U-1800) 0,600'e ayarlanmıştır. 4 saat oda sıcaklığında hareket ettirilmeden bekletilen süspansiyonun üst fazından alınan örneğin optik yoğunluğu 600 nm'de ölçülmüştür. Kültürlerin yüzde otoagregasyon değerleri $[1 - (A_{\text{üstteki süspansiyon}} / A_{\text{toplam bakteri süspansiyonu}})] \times 100$ formülüne göre hesaplanmıştır [Collado ve ark., 2008].

3.2.11. Koagregasyon

Suşların koagregasyon yeteneklerinin belirlenmesinde yüksek EPS üretimi gösteren 2 adet laktobasil (LB74 ve LB61) ve *Escherichia coli* ATCC 11229, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 test bakterileri kullanılmıştır. Laktobasillerin ve test bakterilerinin optik yoğunlukları 600 nm'de 0,600'e ayarlanmıştır. Laktobasiller ve test bakterilerinden eşit hacimlerde cam deney tüplerine alınmış ve homojen bir karışım elde edilmiştir. Karışık süspansiyonun optik yoğunluğu da 600 nm'de ölçülmüştür. Bu süspansiyon oda sıcaklığında 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda karışımın optik yoğunluğu yine 600 nm'de ölçülmüştür. Kültürlerin %koagregasyon yetenekleri $[(A_{\text{test bakterisi}} + A_{\text{laktobasil}}) - 2(A_{\text{karışık süspansiyon}})] / (A_{\text{test bakterisi}} + A_{\text{laktobasil}}) \times 100$ formülüne göre hesaplanmıştır [Collado ve ark., 2008].

3.2.12. Hidrofobisite

Suşların hidrokarbonlara mikrobiyal tutunması Gusils ve arkadaşlarına [2002]'a göre belirlenmiştir. Suşlar MRS sıvı besiyerlerinde, 37°C'de 48 saat aralıklarla ard arda iki kez aktifleştirilmiştir. Aktif kültürler, 10 000 rpm'de 15 dak santrifüj edilmiştir.

Elde edilen pellet, iki kez fosfat tamponu (pH 7,2) ile yıkanmış ve 0,1 M KNO₃ (pH 6,2) tamponu içinde tekrar çözülerek spektrofotometrede (Digilab Hitachi U-1800) OD'si 600 nm de 0,06'ye ayarlanmıştır (A₀). Bakteri süspansiyonundan 2 mL alınarak, 0,5 mL p-ksilen (polar olmayan nötral çözücü), kloroform (monopolar asidik çözücü), etil asetat (monopolar bazik çözücü) ve toluen (unipolar bazik çözücü) hidrokarbonlarının üzerine konularak oda sıcaklığında 10 dak bekletilmiştir. İnkübasyondan sonra ayrılan iki faz, 2 dak vorteks ile karıştırılmış ve tekrar oda sıcaklığında 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra sulu fazın OD'si spektrofotometrede (DigilabHitachi U-1800) 600 nm tekrar ölçülmüştür (A₁).Laktobasil suşlarının hidrokarbonlara mikrobiyal tutunma yüzdesi $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.13. Kolesterol giderimi

Kolesterol giderimi EPS üretimleri yüksek olan *Lactobacillus casei* LB74 ve *Lactobacillus casei* LB61 suşlarında belirlenmiştir. Kolesterol giderimi miktarları Gilliland ve arkadaşları [1985] tarafından modifiye edilen Rudel ve Morris [1973]'in "o-fitalaldehit" metodu üzerinde bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir.

600 nm de optikal yoğunluğu 0,600'e ayarlanan aktif kültürlerinden 5 mL'lik 100 µg/mL oranında kolesterol ile %0,06, %0,15 ve %0,30 konsantrasyonlarında safra içeren MRS sıvı besiortamına %2 oranında inoküle edilerek, 37°C'de geliştirilmişlerdir. İnokülasyon yapılmamış 100 µg/mL oranında kolesterol içeren MRS sıvı besiortamı kontrol olarak kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler 10 000 rpm'de 20 dak santrifüj edilerek, elde edilen berrak kısma serbest hücre ekstraktı (SHE) adı verilmiştir. Hücre pelleti orijinal besiortamına eşit hacimde distile su ile süspanse edilmiştir. SHE ve distile su ile süspanse edilen hücre pelletindeki kolesterol miktarının belirlenmesi için örneklerden 0,5 mL alınarak temiz tüplere dağıtılmıştır. Her bir örnek üzerine 3 mL %95'lik etanol ve 2 mL %50'lik KOH eklenerek iyice karıştırılmıştır. Örnekler 60°C'lik su banyosunda 10 dak ısıtılmıştır. Soğutulan örneklerin üzerine 5 mL hekzan eklenmiş ve 20 sn boyunca vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra 3 mL distile su eklenerek tekrar karıştırılmıştır.

Odasıcaklığında 15 dak bekletilerek, fazların ayrımı sağlanmıştır. Oluşan hekzan tabakasından 2,5 mL temiz test tüplerine alınmış ve 60°C'lik su banyosunda bekletilerek hekzanın tamamen buharlaştırılması sağlanmıştır. Her bir tüpün üzerine 1 mL glasiyel asetik asit içerisinde 0,5 mg o-phthaldialdehyde içeren o-fitalaldehit reagentan 4 mL eklenerek oda sıcaklığında 10 dak bekletilmiştir. Örneklerin üzerine yavaşça 2 mL saf sülfürik asit eklenerek vorteks ile iyice karıştırılmış ve oda sıcaklığında tekrar 10 dak bekletilmiştir. 550 nm dalga boyundaki spektrofotometrede örneklerin optikal yoğunlukları ölçülmüştür. Kolesterol giderimi miktarlarını belirlemek için 10–150 µg/mL arasında değişen oranlarda kolesterol kullanılarak standart bir eğri çıkarılmış ve bu standarda göre örneklerin kolesterol miktarları µg/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 3.3).

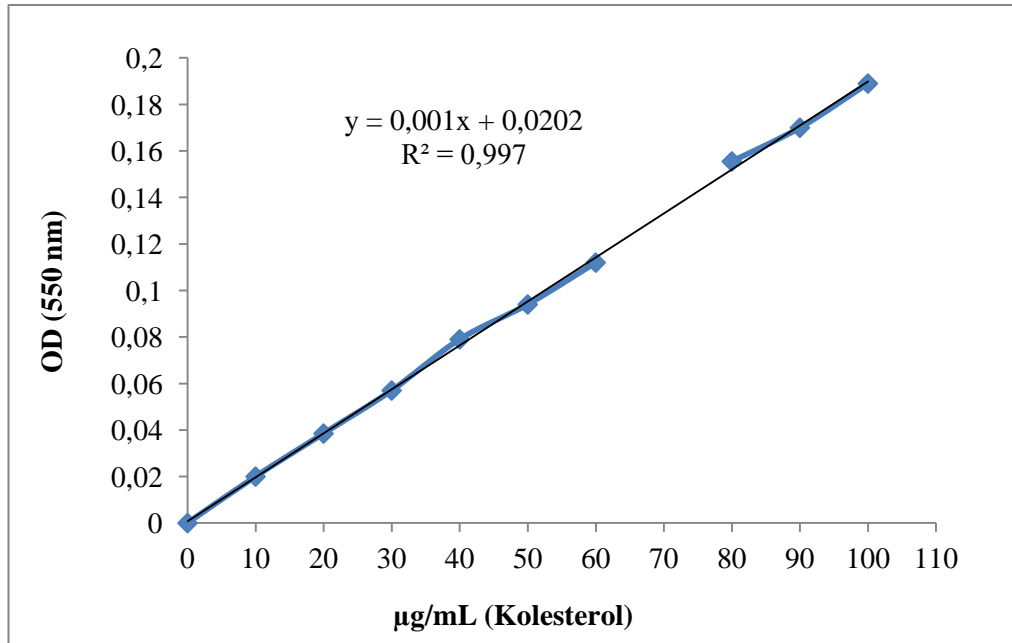
Kolesterol giderimi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$A = 100 - [(B / C) \times 100]$$

A: Kolesterolün giderimi (%).

B: İnokülasyon yapılan besi ortamındaki kolesterol miktarı (µg).

C: İnokülasyon yapılmayan (kontrol) besi ortamındaki kolesterol miktarı (µg).



Şekil 3.3. Kolesterol standart eğrisi

3.2.14. İstatistiksel analizler

Tüm çalışmalarda üç farklı paralelin ortalama sonuçları verilmiştir. İstatistiksel analizlerde SPSS Inc. Software (16.0 Versiyonu; SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılmıştır. Pearson korelasyonuna göre, suşların yüzde asit -EPS, yüzde asit-hidrojen peroksit, hidrojen peroksit-antimikrobiyal aktivite, asit-antimikrobiyal aktivite, EPS-antimikrobiyal aktivite arasında korelasyon olup olmadığı incelenmiştir.

Ayrıca farklı pH ve safra konsantrasyonunun canlılık üzerindeki ilişkiyi ve artan safra konsantrasyonu ile kolesterol giderimleri arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacıyla SPSS 16.0 bilgisayar programı ile regresyon analizi uygulanmıştır.

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. Kùltürlerin farklı besiyerlerindeki pH ve yüzde asit üretimlerinin belirlenmesi

Bakterilerin kùltürünün skim milk (SM) ve MRS besiyerlerinde oluşturduğu pH ve ürettiği yüzde asitlik değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Yapılan çalışmada SM besiyerinde geliştirilen suşların daha fazla asit ürettiği ve besiyerinin pH'sını MRS besiyerine oranla daha fazla düşürdüğu gözlemlenmiştir. Bu durumu ispatlamak için çift örneklı T-testi ile istatistiksel analiz yapılmış ve iki besiyerindeki asit üretimleri arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir. Suşların bu iki besiyerindeki yüzde asit üretimleri arasında doğrusal bir korelasyon olduğu görölmüş ve $r=0,563$ olduğundan bu ilişki orta düzeyde anlamlıdır ($p<0,05$). Yüksek oranda asit üreten suşların bulunduğu besiyerinin pH'sının daha düşük olduğu görölmüştür. Yüzde asit üretimi arttıkça besiyerinin pH'sı düşmektedir. Son kùltür pH'sı ile yüzde asitlik arasında ters yönlü bir korelasyon bulunmaktadır. $r= -0,480$ olduğundan bu ilişki zayıf bir şekilde anlamlıdır ($p<0,05$).

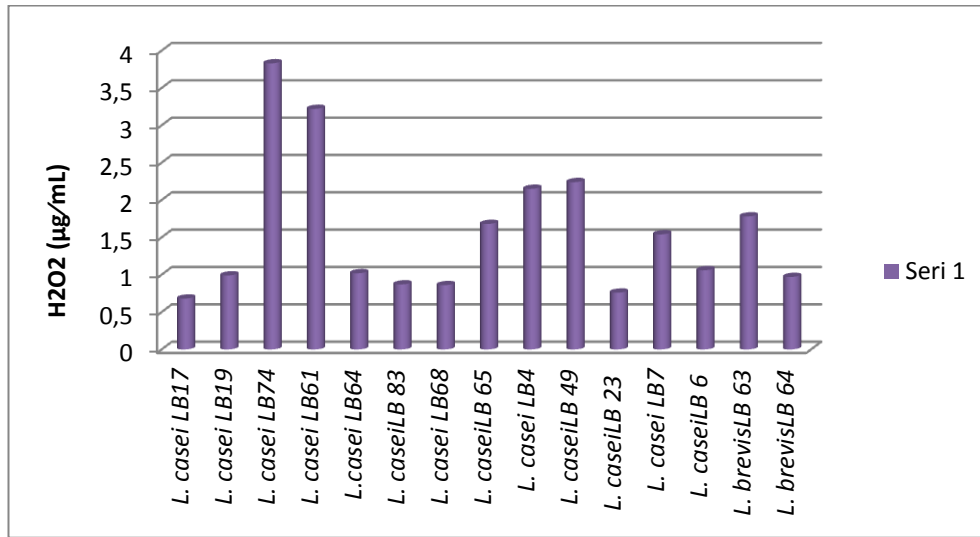
Her iki besiyerinde de yüzde asit üretimi en yüksek olan suşlar *Lactobacillus casei* LB74 (SM'de %2,79; MRS'de %1,50) ve *L. casei* LB61 (SM'de %2,72; MRS'de %1,23) dir. En düşük asit üretimi ise *L. casei* LB83 suşunda tespit edilmiştir (SM'de %1,05; MRS'de %0,45).

Çizelge 4.1. Laktobasillerin MRS ve SM besiyerlerindeki pH ve yüzde asitlikleri

Bakteriler	Skim Milk		MRS	
	pH	% Asitlik	pH	% Asitlik
<i>L. casei</i> LB17	4,04±0,00	1,44±0,06	4,52±0,03	0,73±0,02
<i>L. casei</i> LB19	4,02±0,01	1,84±0,01	4,21±0,07	1,10±0,00
<i>L. casei</i> LB74	3,94±0,00	2,79±0,03	4,33±0,00	1,50±0,13
<i>L. casei</i> LB61	3,98±0,01	2,72±0,03	4,17±0,02	1,23±0,07
<i>L. casei</i> LB64	3,98±0,01	2,12±0,01	4,21±0,07	1,20±0,01
<i>L. casei</i> LB83	4,03±0,00	1,05±0,03	5,62±0,15	0,45±0,00
<i>L. casei</i> LB68	4,21±0,01	1,36±0,01	4,57±0,01	0,85±0,00
<i>L. casei</i> LB65	4,03±0,00	1,61±0,01	4,39±0,05	1,01±0,01
<i>L. casei</i> LE4	4,47±0,00	1,26±0,01	5,10±0,03	0,63±0,00
<i>L. casei</i> LB49	4,02±0,00	1,73±0,03	4,22±0,04	1,09±0,05
<i>L. casei</i> LB23	4,02±0,01	2,11±0,03	4,20±0,03	1,12±0,00
<i>L. casei</i> LE7	4,45±0,01	1,20±0,01	5,05±0,35	0,81±0,00
<i>L. casei</i> LB6	4,31±0,01	1,35±0,03	5,04±0,01	0,82±0,02
<i>L. brevis</i> LB63	4,05±0,02	1,44±0,04	4,57±0,01	0,67±0,01
<i>L. fermentum</i> LB16	3,67±0,04	1,61±0,01	4,39±0,05	1,03±0,00

4.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Üretimi

Spektrofotometrik olarak belirlenen laktobasil suşlarının oluşturduğu hidrojen peroksit üretim miktarları 0,68 (*L. casei* LB17)–3,83 (*L. casei* LB74) µg/mL arasında değişmektedir (Şekil 4.1). Genel olarak bir değerlendirme yapıldığında, yüzde asitliği yüksek olan suşların hidrojen peroksit üretimlerinin de yüksek olduğu tespit edilmiştir. Suşların yüzde asitlikleri ve hidrojen peroksit üretimleri arasında doğrusal bir korelasyon olduğu görülmüş ve $r=0,634$ olduğundan bu ilişki orta düzeyde anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 4.1. Laktobasillerin hidrojen peroksit üretim miktarları (µg/mL)

4.3. Antibiyotik Duyarlılık

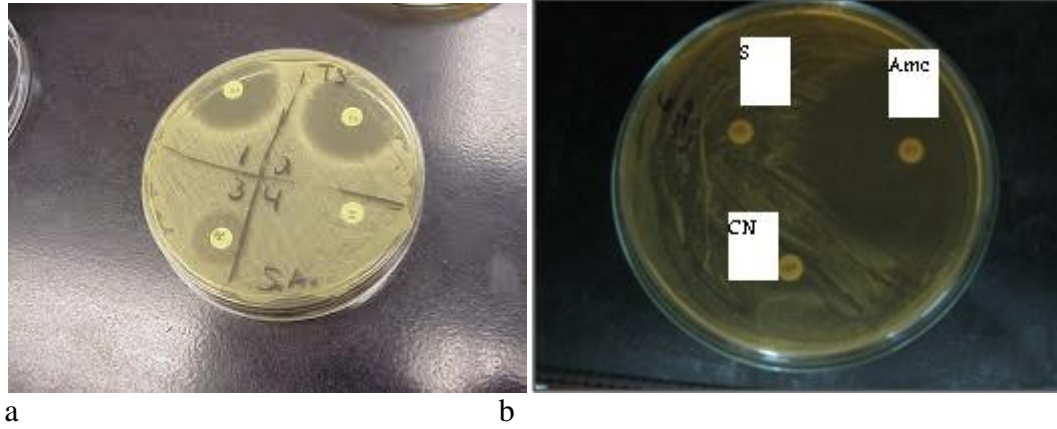
Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi bakterilerin probiyotik olarak kullanılabilmesinde belirleyici bir özelliktir. Laktobasil suşları ile hücre duvar sentezini inhibe eden penisilin (10 unit), amoksisilin (30 µg), vankomisin (30 mcg), azitromisin (15 µg), teikoplanin (30 µg) ve eritromisin (15 µg), protein sentezini inhibe eden streptomisin (10 µg), gentamisin (10 µg), ve kloramfenikol (30 µg), bakterilerin DNA giraz enzimini inhibe eden siprofloksasin (5 µg) antibiyotiklerine duyarlılıkları disk difüzyon yöntemine göre belirlenmiş, sonuçlar Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) standardına (Çizelge 4.2) göre değerlendirilmiştir (Çizelge 4.3).

Bakterilerin hepsinin streptomisin ve vankomisin antibiyotiklerine karşı dirençli, kloramfenikol, penisilin ve amoksisilin antibiyotiklerine karşı ise duyarlı oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.2). Protein sentezini inhibe eden streptomisin (%100), gentamisin (%99), hücre duvar sentezini inhibe eden vankomisin (%100) ve teikoplanin (%98) antibiyotikleri, laktobasil suşlarının yüksek dirençlilik gösterdikleri antibiyotikler olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, suşlarının hücre duvar sentezini inhibe eden penisilin (%100), amoksisilin (%100), azitromisin (%98) ve eritromisin (%95), protein sentezini inhibe eden kloramfenikol (%100)

antibiyotiklerine ise duyarlı oldukları bulunmuştur. Resim 4.1'de *L. casei* LB61 ve *L. casei* LB74 suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.2. CLSI kriterlerine göre antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi

Etki Mekanizması	Antibiyotik	Dirençli	Orta duyarlı	Duyarlı
Hücre Duvarı Sentezi İnhibitörü	Penisilin (P) 10U	≤19	20-27	≥28
Hücre Duvarı Sentezi İnhibitörü	Vankomisin (VA) 30mcg	≤14	15-16	≥17
Hücre Duvarı Sentezi İnhibitörü	Amoksisilin (AMC) 30µg	≤13	14-17	≥18
Hücre Duvarı Sentezi İnhibitörü	Azitromisin (AZM) 15µg	≤13	14-17	≥18
Hücre Duvarı Sentezi İnhibitörü	Teikoplanin (TEC) 30µg	≤10	11-13	≥14
Hücre Duvarı Sentezi İnhibitörü	Eritromisin (E) 15µg	≤13	14-22	≥23
Protein Sentezi İnhibitörü	Gentamisin (CN) 10µg	≤12	13-14	≥15
Protein Sentezi İnhibitörü	Streptomisin (S) 10µg	≤11	12-14	≥15
Protein Sentezi İnhibitörü	Kloramfenikol (C) 10µg	≤12	13-17	≥18
DNA Giraz enzimi inhibitörü	Siprofloksasin (CIP) 5µg	≤15	16-20	≥21

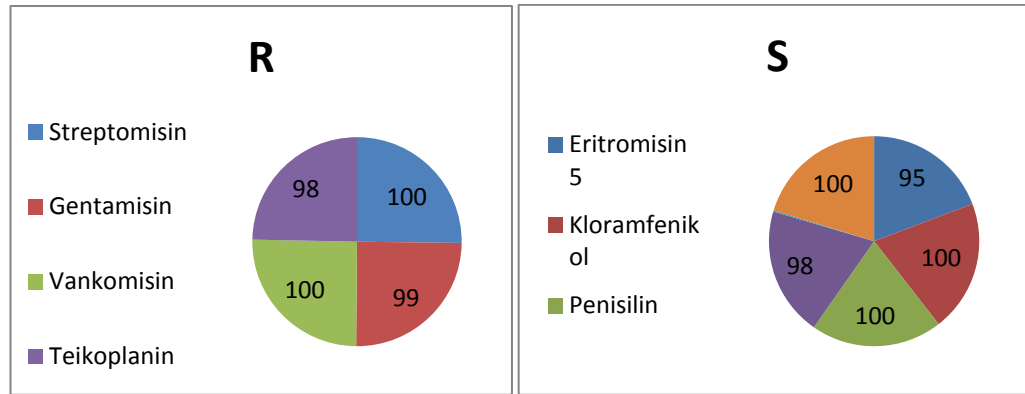


Resim 4.1. a: *L. casei* LB61 (1-Siprofloksasin 2-Eritromisin, 3-Gentamisin, 4-Streptomisin) b: *L. casei* LB6 suşlarının antibiyotik duyarlılıkları (Gentamisin, Streptomisin, Amoksilin).

Çizelge 4.3. Laktobasil suşlarının antibiyotiklere gösterdiği duyarlılık test sonuçları

Bakteriler	Antibiyotikler									
	P	S	CN	C	VA	AMC	E	CIP	TEC	AZM
<i>L. casei</i> LB17	S	R	R	S	R	S	S	R	R	R
<i>L. casei</i> LB19	S	R	R	S	R	S	S	S	R	S
<i>L. casei</i> LB74	S	R	R	S	R	S	I	R	R	S
<i>L. casei</i> LB61	S	R	R	S	R	S	I	I	R	S
<i>L. casei</i> LB64	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S
<i>L. casei</i> LB83	S	R	R	S	R	S	S	I	S	S
<i>L. casei</i> LB68	S	R	R	S	R	S	S	I	R	R
<i>L. casei</i> LB65	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S
<i>L. casei</i> LE4	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S
<i>L. casei</i> LB49	S	R	R	S	R	S	I	R	R	S
<i>L. casei</i> LB23	S	R	R	S	R	S	S	I	R	S
<i>L. casei</i> LE7	S	R	I	S	R	S	I	R	R	S
<i>L. casei</i> LB6	S	R	R	S	R	S	S	R	S	S
<i>L. brevis</i> LB63	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S
<i>L. fermentum</i> LB16	S	R	R	S	R	S	I	R	R	S

R: Dirençli, S: Duyarlı, I: Orta Derece Duyarlı



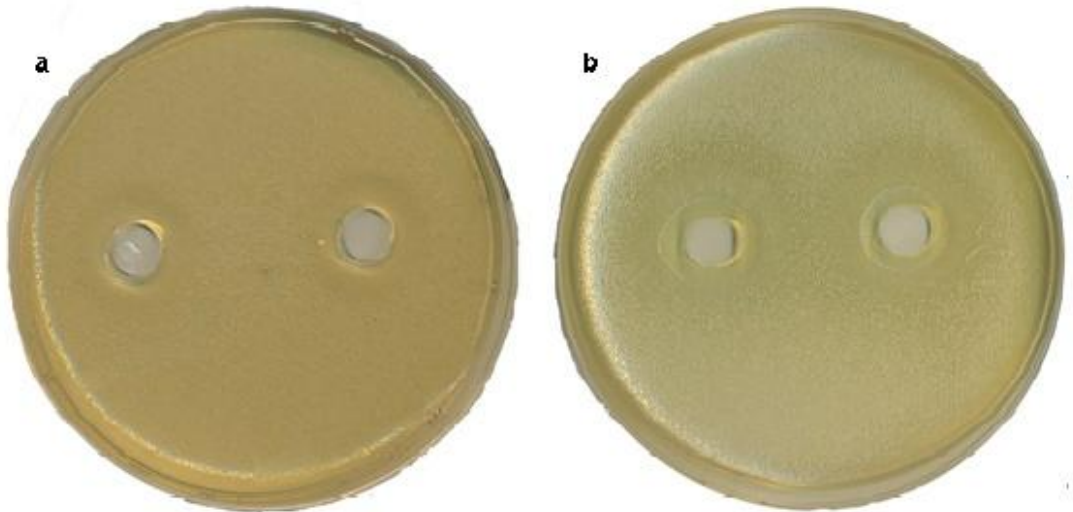
Şekil 4.2. Laktobasil suşlarının antibiyotiklere gösterdiği %duyarlılık ve dirençlilik oranları

4.4. Antimikrobiyal Aktivite

Laktobasil suşlarının bebeklerde hastalığa neden olan patojen bakterilerden (*Escherichia coli* ATCC 11229, *Salmonella typhimurium* MU 80, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) üzerine inhibisyon etkileri agar difüzyon yöntemine göre belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Genel olarak sonuçlar değerlendirildiğinde;

Escherichia coli ATCC 11229 üzerinde antimikrobiyal aktivitenin en yüksek olduğu suşun *Lactobacillus casei* LB68 (5,7 mm); en düşük olduğu suşun ise *L. casei* LB23 (2,8 mm) olduğu belirlenmiştir ve *L. casei* LB49 suşunda ise inhibisyon görülmemiştir. *L. casei* LB23 ve LB61 suşlarının *E. coli* ATCC 11229 suşu üzerine gösterdiği inhibisyon etkisi Resim 4.2’de gösterilmiştir.



Resim 4.2 a: *L. casei* LB23 suşunun b: *L. casei* LB61 suşunun *E. coli* test bakterisine karşı oluşturduğu inhibisyon zonu.

Çizelge4.4. Laktobasil suşlarının test bakterileri üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çap değerleri (mm).

Bakteriler	<i>E. coli</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>L. casei</i> LB17	3,40±0,00	2,80±0,00	5,10±0,00	2,70±0,00	5,00±0,01	-
<i>L. casei</i> LB19	5,60±0,00	15,20±0,00	7,50±0,02	2,80±0,00	2,80±0,00	5,00±0,00
<i>L. casei</i> LB74	4,80±0,01	-	5,20±0,00	2,80±0,00	4,70±0,00	2,70±0,00
<i>L. casei</i> LB61	5,20±0,00	21,80±0,00	7,00±0,00	5,40±0,00	5,00±0,00	3,40±0,00
<i>L. casei</i> LB64	5,20±0,00	12,60±0,00	8,90±0,00	6,90±0,00	5,30±0,00	6,00±0,00
<i>L. casei</i> LB83	3,50±0,00	-	2,70±0,00	3,80±0,00	2,90±0,00	2,70±0,00
<i>L. casei</i> LB68	5,70±0,00	16,70±0,00	2,80±0,00	2,80±0,00	2,80±0,00	7,30±0,00
<i>L. casei</i> LB65	4,60±0,00	16,60±0,00	5,20±0,00	7,20±0,00	9,30±0,00	4,80±0,00
<i>L. casei</i> LE4	4,60±0,00	14,60±0,01	7,30±0,00	7,70±0,00	5,00±0,00	-
<i>L. casei</i> LB49	-	7,40±0,01	5,00±0,00	7,20±0,01	6,50±0,00	2,90±0,00
<i>L. casei</i> LB23	2,80±0,00	4,70±0,00	5,40±0,01	7,30±0,00	5,50±0,00	4,70±0,00
<i>L. casei</i> LE7	4,90±0,00	7,30±0,00	5,70±0,00	9,60±0,01	7,10±0,03	-
<i>L. casei</i> LB6	5,20±0,00	5,20±0,00	5,50±0,00	5,20±0,00	3,80±0,00	3,80±0,00
<i>L. brevis</i> LB63	4,60±0,00	4,70±0,00	2,80±0,00	5,10±0,00	2,70±0,00	1,80±0,00
<i>L. fermentum</i> LB16	3,30±0,00	1,80 ±0,00	2,80±0,00	5,50±0,00	1,70±0,00	-

-: inhibisyon yok

Laktobasil suşlarının %86,67'si *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 test bakterisine karşı inhibisyon etkisi gösterirken, en yüksek inhibisyon etkisi *L. casei* LB61 (21,8 mm) suşunda tespit edilmiştir. Bu suşun aynı zamanda denenen tüm test bakterileri içerisinde en yüksek inhibisyon zonuna sahip olduğu gözlenmiştir.

Salmonella enteritidis ATCC 13076 test bakterisi üzerine, laktobasil suşlarının hepsi inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Bakterilerden maksimum inhibisyon

etkisini *L. casei* LB64 (8,9 mm) suşu gösterirken, en düşük inhibisyon etkisini *L. casei* LB83 (2,7 mm) suşu göstermiştir.

Laktobasil suşlarının %100'ü *Salmonella typhimurium* MU 80 test bakterisine karşı inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenirken, en yüksek inhibisyon etkisi 9,6 mm zon çapı oluşturan *L. casei* LE7 suşunda gözlenmiştir.

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 test bakterisi üzerinde en büyük zon çap değeri 9,3 mm ile *L. casei* LB65 suşunda, en küçük zon çap değeri ise 1,7 mm ile *L. fermentum* LB16 suşunda görülmüştür.

Staphylococcus aureus ATCC test bakterisi üzerinde 4 suş (*L. casei* LB17, LE4, LE7, *L. fermentum* LB16) inhibisyon göstermezken, diğer suşların inhibisyon çap değerleri 1,8 mm (*L. brevis* LB63) ile 7,3 mm (*L. casei* LB68) arasında değişmektedir.

Antimikrobiyal aktivite çalışma sonucunda elde edilen sonuçlara göre kültürlerin antimikrobiyal etkinliği suşa göre değişkenlik göstermektedir. Antimikrobiyal aktivitesi yüksek olan bazı suşların yüzde asit üretimi de yüksek olan suşlardır. Suşların antimikrobiyal aktivitesi ile asit üretimi ve hidrojen peroksit üretimi arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmak için korelasyon testi yapılmıştır. Ancak, bu analizler sonucunda antimikrobiyal aktivite, asit üretimi ve hidrojen peroksit üretimi arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilememiştir.

4.5. Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi

Bakterilerin EPS üretim miktarları, fenol sülfürik asit metodu ile spektrofotometrik olarak tespit edilmiş, buna göre tüm suşların EPS miktarları Çizelge 4.5'de verilmiştir. Bu verilere göre suşların EPS üretim miktarları 142,99–425,16 mg/L arasında değişiklik göstermiştir. EPS üretimi en yüksek olan suş *L. casei* LB74'dır. Diğer yüksek miktarda EPS üretimi gösteren suşlar ise, *L. casei* LB61 (383,99 mg/L), *L. casei* LB49 (369,19 mg/L) ve *L. brevis* LB63 (348,3 mg/L)'dir. EPS

üretimi en düşük suşun ise *L. casei* LB17 (142,99 mg/L) olduğu belirlenmiştir. Suşların EPS üretimi ile asit üretimi arasında yapılan istatistiksel analizlerle anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir.

Çizelge 4. 5. Laktobasillerin ekzopolisakkarit üretim miktarları (mg/L)

Bakteriler	EPS (mg/L)
<i>L. casei</i> LB17	142,99±6,38
<i>L. casei</i> LB19	258,57±2,61
<i>L. casei</i> LB74	425,16±2,03
<i>L. casei</i> LB61	383,99±1,75
<i>L. casei</i> LB64	317,01±2,32
<i>L. casei</i> LB83	278,30±5,00
<i>L. casei</i> LB68	275,50±1,42
<i>L. casei</i> LB65	183,06±6,50
<i>L. casei</i> LE4	329,26±1,49
<i>L. casei</i> LB49	369,19±3,17
<i>L. casei</i> LB23	186,63±6,99
<i>L. casei</i> LE7	319,37±1,39
<i>L. casei</i> LB6	294,46±3,42
<i>L. brevis</i> LB63	348,30±2,13
<i>L. fermentum</i> LB16	326,63±3,81

4.6. Farklı pH Değerlerine Tolerans

Bakterilerin farklı pH değerlerine yüzde canlılıkları spektrofotometredeki hücre yoğunluklarına göre belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Ortamdaki asitlik oranı arttıkça, bakterilerin optikal yoğunluğunda ve canlılıklarında önemli oranda düşme meydana gelmiştir. Suşların pH değerindeki azalmaya bağlı olarak optikal yoğunluklarındaki azalma arasındaki korelasyon regresyon analizi ile belirlenmiş ve multipli R değerleri 0,75'den yüksek çıktığından güçlü bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.6).

Suşların genelinde pH 2'de yoğunluğunun düştüğü ancak yine de canlılıklarını korudukları gözlenmiştir. pH 2'de suşların asit dirençliliği değerlendirildiğinde en düşük bakteri yoğunluğu *L. casei* LB74 (0,12 OD) suşunda, en yüksek bakteri yoğunluğu ise *L. casei* LB65 (0,26 OD) suşunda tespit edilmiştir. pH 3'de yüzde canlılık oranı %7,42 ile %17,01 arasında tespit edilirken, en düşük hücre yoğunluğu

L. casei LB74 (0,15 OD) suşunda, en yüksek hücre yoğunluğu ise *L. casei* LB65 (0,34 OD) suşunda belirlenmiştir. pH 4’de hücre yoğunluğu pH 2 ve 3’e göre artış göstermiştir. Hücre yoğunluğu en düşük *L. casei* LB23 (0,62 OD) suşunda, en yüksek *L. casei* LE4 (1,92 OD) suşunda belirlenmiştir. pH 5’de, en düşük hücre yoğunluğu *L. casei* LB74 ve *L. casei* LB64 (1,85 OD) suşlarında, en yüksek hücre yoğunluğu ise *L. casei* LB17 (1,97 OD) suşunda belirlenmiştir. pH 5’de kontrol grubuna göre canlılık oranında çok fazla bir düşüş tespit edilmemiştir.

Yüksek EPS üretimi gösteren *L. casei* LB74, LB61 ve LB49 suşların farklı pH değerlerinde direncinin zayıf olduğu görülmüştür. Yapılan istatistiksel analizde, suşların EPS üretimleri ile asit direnci ($r=-0,583$) arasında negatif yönde orta düzeyde anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p<0,05$).

Çizelge 4.6. Laktobasillerin farklı pH değerlerine toleransı ve regresyon analiz sonuçları

Bakteriler	pH 6,2 (Kontrol)	pH 5,0		pH 4,0		pH 3,0		pH 2,0		Multiple R değeri	Significant F
	OD ^a	OD ^b	% Canlılık ^c	OD ^b	% Canlılık ^c	OD ^b	% Canlılık ^c	OD ^b	% Canlılık ^c		
<i>L. casei</i> LB17	1,98±0,02	1,97±0,00	99,49	1,89±0,00	95,45	0,30±0,00	15,15	0,23±0,00	11,61	0,87	0,05
<i>L. casei</i> LB19	1,98±0,01	1,92±0,00	96,97	0,74±0,05	37,37	0,26±0,00	13,13	0,24±0,01	12,12	0,93	0,01
<i>L. casei</i> LB74	2,02±0,02	1,84±0,08	91,09	0,64±0,01	31,68	0,15±0,01	7,42	0,12±0,01	5,94	0,95	0,01
<i>L. casei</i> LB61	1,94±0,00	1,85±0,02	95,36	0,64±0,04	32,99	0,23±0,02	11,85	0,22±0,00	11,34	0,93	0,02
<i>L. casei</i> LB64	1,91±0,00	1,85±0,01	96,86	0,64±0,02	33,51	0,22±0,00	11,52	0,21±0,00	10,99	0,93	0,02
<i>L. casei</i> LB83	1,99±0,00	1,93±0,05	96,98	1,87±0,08	93,97	0,32±0,00	16,08	0,20±0,00	10,05	0,88	0,04
<i>L. casei</i> LB68	1,97±0,00	1,93±0,01	97,97	1,92±0,00	97,46	0,25±0,00	12,69	0,21±0,00	10,66	0,86	0,05
<i>L. casei</i> LB65	2,01±0,00	1,96±0,02	97,51	1,91±0,01	95,02	0,34±0,02	16,91	0,26±0,00	12,93	0,87	0,05
<i>L. casei</i> LE4	1,97±0,00	1,94±0,00	98,48	1,92±0,01	97,46	0,27±0,01	13,70	0,23±0,00	11,67	0,86	0,05
<i>L. casei</i> LB49	1,96±0,01	1,92±0,00	97,96	0,99±0,00	50,51	0,25±0,00	12,75	0,24±0,00	12,24	0,94	0,01
<i>L. casei</i> LB23	1,94±0,00	1,29±0,00	66,49	0,62±0,02	31,96	0,24±0,00	12,37	0,23±0,01	11,85	0,96	0,01
<i>L. casei</i> LE7	1,97±0,00	1,94±0,00	98,48	1,81±0,00	91,88	0,32±0,00	16,24	0,20±0,00	10,15	0,89	0,04
<i>L. casei</i> LB6	1,94±0,00	1,88±0,00	96,91	0,81±0,00	41,75	0,33±0,00	17,01	0,23±0,00	11,85	0,94	0,01
<i>L. brevis</i> LB63	1,98±0,01	1,88±0,02	94,95	0,98±0,00	49,49	0,23±0,00	11,61	0,20±0,00	10,10	0,95	0,01
<i>L. fermentum</i> LB16	2,00±0,00	1,87±0,03	93,50	0,51±0,00	25,50	0,26±0,00	13,00	0,22±0,02	11,00	0,92	0,02

a: Kontrol; çalışmada kullanılan besiyerinin pH' sı

b: Spektrofotometrede 600 nm de belirlenen yoğunluk (OD)

c: %Canlılık = $(OD_1/OD_2) \times 100$; OD₁: Test OD değeri, OD₂: Kontrol OD değeri

4.7. Farklı Safra Konsantrasyonlarına Tolerans

Bakterilerin safra konsantrasyonlarına tolerans sonuçları Çizelge 4.7’de verilmiştir. Tüm suşlardan elde edilen verilere göre bakterilerin bağırsaklarda bulunan safraya olan toleransı, safra oranına göre değişmekte olup, safranın %0,06; %0,15 ve %0,30 artan konsantrasyona bağlı olarak tüm suşların gelişiminde ve canlılığında düşme gözlenmiştir. Suşların safra konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak optikal yoğunluklarındaki azalma arasındaki korelasyon regresyon analizi ile belirlenmiş ve bu ilişkinin yüksek derecede ve negatif yönde bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.7).

Bakteriler ortamda bulunan safrayı belirli bir seviyeye kadar tolere edebilmektedir. Ancak safra konsantrasyonu yükseldikçe ve özellikle %0,30 oranındaki safranın varlığında tüm suşların yoğunluğunda azalma tespit edilmiştir. Farklı safra konsantrasyonlarındaki yüzde canlılık değerlendirildiğinde, %0,06 safra konsantrasyonunda %94,90-99,00, %0,15 safra konsantrasyonunda %79,90-98,46 ve %0,30 konsantrasyonunda %9,28 ile %31,50 oranlarında olduğu tespit edilmiştir. En yüksek inhibisyon %0,30 safra konsantrasyonunda *L. casei* LE7 (%90,72) suşunda gözlenmiştir. %0,06 safra konsantrasyonunda ise *L. brevis* LB63 (%5,10) suşu en yüksek inhibisyonu göstermiştir. %0,06 ve %0,15 safra konsantrasyonlarında suşların optikal yoğunluklarında kontrol grubuna göre çok fazla bir düşüş gözlenmezken, %0,30 safra konsantrasyonunda bakterilerin üremelerinde diğer konsantrasyonlara göre azalma olduğu gözlenmiştir.

Bakteriler arasında safraya karşı en dirençli suşların *L. casei* LB4 ve LB17 olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). Yapılan istatistiksel analizlerde, suşların EPS üretimleri ile farklı safra konsantrasyonlarına direnç arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Çizelge 4.7. Laktobasillerin farklı safra konsantrasyonlarına toleransı ve regresyon analiz sonuçları

Bakteriler	% 0,00 (Kontrol)	% 0,06		% 0,15		% 0,30		Multiple R değeri	Significan t F
	OD ^a	OD ^b	% Canlılık ^c	OD ^b	% Canlılık ^c	OD ^b	% Canlılık ^c		
<i>L. casei</i> LB17	1,95±0,00	1,93±0,00	98,97	1,92±0,00	98,46	0,20±0,00	10,26	-0,887	0,11
<i>L. casei</i> LB19	2,02±0,02	1,94±0,03	96,04	1,74±0,00	86,14	0,56±0,00	27,72	-0,949	0,05
<i>L. casei</i> LB74	2,00±0,00	1,98±0,01	99,00	1,73±0,00	86,50	0,63±0,00	31,50	-0,949	0,05
<i>L. casei</i> LB61	1,96±0,00	1,92±0,01	97,96	1,57±0,03	80,10	0,52±0,01	26,53	-0,968	0,03
<i>L. casei</i> LB64	1,99±0,00	1,95±0,01	97,99	1,72±0,01	86,43	0,39±0,00	19,60	-0,941	0,05
<i>L. casei</i> LB83	1,99±0,00	1,93±0,00	96,99	1,88±0,01	94,47	0,20±0,00	10,05	-0,904	0,09
<i>L. casei</i> LB68	1,97±0,00	1,95±0,01	98,99	1,77±0,00	89,85	0,41±0,00	20,81	-0,928	0,07
<i>L. casei</i> LB65	1,99±0,00	1,96±0,00	98,49	1,74±0,01	87,44	0,32±0,04	16,08	-0,935	0,06
<i>L. casei</i> LE4	1,94±0,00	1,91±0,00	98,45	1,87±0,00	96,39	0,30±0,00	15,46	-0,897	0,10
<i>L. casei</i> LB49	1,98±0,00	1,94±0,02	97,98	1,76±0,00	88,89	0,49±0,00	24,75	-0,935	0,06
<i>L. casei</i> LB23	2,01±0,00	1,94±0,00	96,52	1,77±0,00	88,06	0,44±0,00	21,89	-0,937	0,06
<i>L. casei</i> LE7	1,94±0,00	1,92±0,00	98,97	1,61±0,00	82,99	0,18±0,00	9,28	-0,946	0,05
<i>L. casei</i> LB6	1,94±0,00	1,92±0,00	98,97	1,55±0,00	79,90	0,20±0,00	10,31	-0,956	0,04
<i>L. brevis</i> LB63	1,96±0,02	1,86±0,03	94,90	1,79±0,00	91,33	0,60±0,01	30,61	-0,926	0,07
<i>L. fermentum</i> LB16	2,01±0,01	1,94±0,01	96,52	1,94±0,01	96,52	0,45±0,00	22,39	-0,897	0,10

a: Kontrol; çalışmada kullanılan besiyerinin pH' sıdır

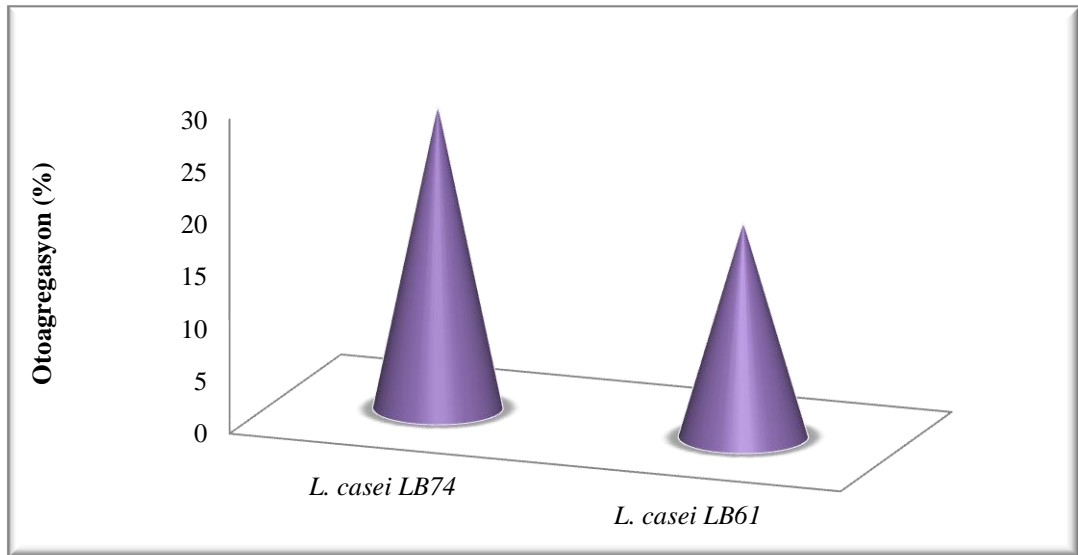
b: Spektrofotometrede 600 nm de belirlenen yoğunluk (OD)

c: %Canlılık = $(OD_1/OD_2) \times 100$; OD₁: Test OD değeri, OD₂: Kontrol OD değeri

4.8. Otoagregasyon ve Koagregasyon

Bu çalışmada otoagregasyon ve koagregasyon yeteneklerinin belirlenmesinde EPS üretimi yüksek olan suşlar (*L. casei* LB74, *L. casei* LB61) kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda kültürlerin yüzde otoagregasyon yetenekleri Şekil 4.3'de verilmiştir. Yine aynı suşların *Escherichia coli* ATCC 11229, *Salmonella enteritidis* ATCC 13086 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 764 test bakterileri ile koagregasyon olabilme yetenekleri ise Şekil 4.4'de yüzde olarak belirtilmiştir.

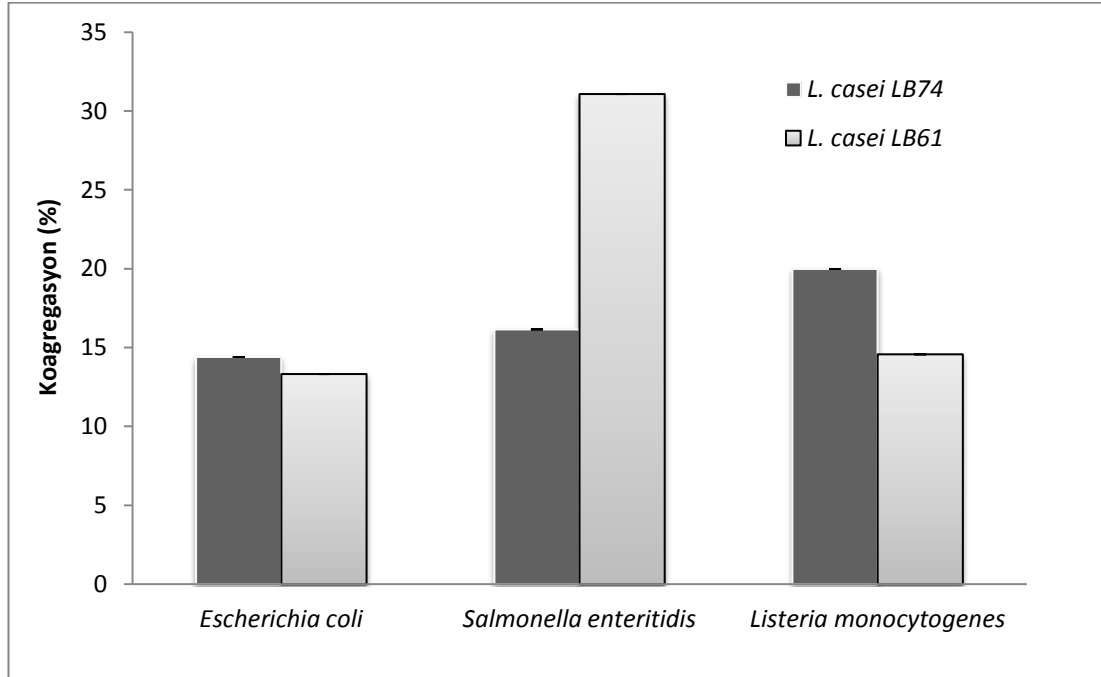
Elde edilen sonuçlara göre, *L. casei* LB74 suşunun yüzde otoagregasyon değerinin %28,91, *L. casei* LB61 suşunun ise %20,5 olduğu tespit edilmiştir. EPS üretimi yüksek olan *L. casei* LB74 suşunun otoagregasyonu da yüksek bulunmuştur.



Şekil 4.3. *L. casei* LB74 ve *L. casei* LB61 suşlarının %otoagregasyonu

Bakterilerin *E. coli* ATCC 11229 ile koagregasyon sonuçları değerlendirildiğinde, *L. casei* LB74 suşunun (%14,41) *L. casei* LB61 (%13,33) suşundan daha yüksek olduğu belirlenmiştir. *L. casei* LB74 ve *L. casei* LB61 suşları ile *Salmonella enteritidis* ATCC 13076'nın %koagregasyonu değerlendirildiğinde ise, *L. casei* LB61 (%31,08) suşu *L. casei* LB74 (%16,16) suşundan daha yüksek %koagregasyon göstermiştir. *Listeria monocytogenes* ATCC 764 test bakterisi ile *L. casei* LB74 ve *L. casei* LB61 suşlarının koagregasyonunda yine *L. casei* LB74 suşunun (%19,99)

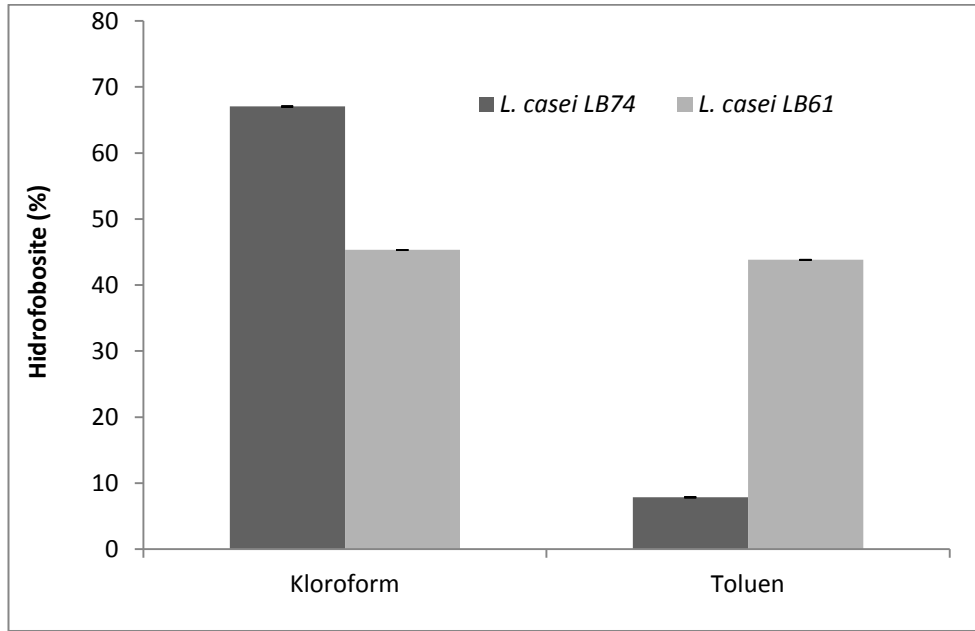
L. casei LB61 (%14,58) suşundan daha yüksek olduğu gözlenmiştir. EPS üretimi yüksek olan *L. casei* LB74 (425,16 mg/L) suşunun *E. coli* ATCC 11229 ve *L. monocytogenes* ATCC 764 test bakterileri ile koagregasyon yetenekleri, *L. casei* LB61 suşundan daha yüksek çıkmıştır.



Şekil 4.4. *L. casei* LB74 ve *L. casei* LB61 suşlarının %koagregasyonu

4.9. Hidrofobisite

EPS üretim kapasitesi yüksek olan *L. casei* LB74 ve *L. casei* LB61 suşlarının hücre yüzeyi hidrofobikliği yüzde olarak belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 4.5’de verilmiştir. Genel olarak hidrofobisite sonuçları değerlendirildiğinde, suşların nötral çözücü olan p-ksilene ve bazik çözücü olan etil asetata ilgisinin olmadığı tespit edilmiştir. Suşların asidik çözücü olan kloroforma ilgisinin yüksek olduğu gözlenmiştir. *L. casei* LB74 suşunun kloroforma %67,05, *L. casei* LB61 suşunun ise kloroforma %45,33 oranlarında hidrofobisite gösterdiği belirlenmiştir. Suşların toluene ilgisinin ise %7,88 (*L. casei* LB74) ve %43,83 (*L. casei* LB61) olduğu tespit edilmiştir. Kloroform ve toluen ilgisinin yüksek olması *L. casei* LB74 ve *L. casei* LB61 suşlarının yüzey yapılarının kompleks olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.5. *L. casei* LB74 ve *L. casei* LB61 suşlarının %hidrofobisitetleri

4.10. Kolesterol Giderimi

Yüksek EPS üretimine sahip *L. casei* LB74 ve *L. casei* LB61 suşlarının safrasız ortamda ve farklı safra konsantrasyonlarında kolesterol giderim kapasiteleri Çizelge 4.8'de gösterilmiştir. Test edilen suşların tamamı serbest hücre ekstratlarında (SHE) ve pellette kolesterolü belirli miktarlarda uzaklaştırmıştır. EPS üretimi yüksek olan *L. casei* LB74 suşunun, EPS üretimi daha düşük olan *L. casei* LB61 suşuna göre hem SHE hem de pellette biraz daha fazla kolesterol giderimi kabiliyeti olduğu tespit edilmiştir. Her iki suşun pellette kolesterol giderimlerinin daha fazla olduğu görülmektedir. En yüksek kolesterol giderimini %0,30 oranında safra içeren ortamda *L. casei* LB74 suşunun (%66) gerçekleştirdiği saptanmıştır.

Artan safra konsantrasyonuna bağlı olarak %kolesterol gideriminin de arttığı belirlenmiştir. Suşların safra konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak kolesterol giderimindeki artma arasındaki korelasyon regresyon analizi ile belirlenmiş ve multipli R değerleri 0,75'den yüksek çıktığından güçlü bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. *L. casei* LB74 ve *L. casei* LB61 suşlarının safrasız ve farklı safra konsantrasyonlarında yüzde kolesterol giderimleri ve regresyon analiz sonuçları

Bakteri	%0,0 ¹		%0,06 safra ²		%0,15 safra ³		%0,30 ⁴ safra		Multiple R değeri		Significant F	
	SHE	Pellet	SHE	Pellet	SHE	Pellet	SHE	Pellet	SHE	Pellet	SHE	Pellet
LB 74	33±0,1	47±0,1	37±0,2	52±0,1	48±0,4	55±0,2	53±0,4	66±0,1	0,963	0,991	0,03	0,008
LB 61	30±0,1	40±0,2	36±0,2	46±0,2	49±0,1	50±0,1	50±0,4	64±0,4	0,901	0,992	0,09	0,008

- 1: Yalnızca 100 µg/mL oranında kolesterol içeren besiortamında kolesterol giderimi
2: 100 µg/mL oranında kolesterol ve %0,06 oranında safra içeren besiortamında kolesterol giderimi
3: 100 µg/mL oranında kolesterol ve %0,15 oranında safra içeren besiortamında kolesterol giderimi
4: 100 µg/mL oranında kolesterol ve %0,30 oranında safra içeren besiortamında kolesterol giderimi

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Fonksiyonel gıda bileşenleri olarak değerlendirilen probiyotik bakterilerin insan mide bağırsak sistemi açısından önemli etkileri bulunmaktadır. Probiyotiklerin farklı nedenlere bağlı bağırsak rahatsızlıkları, *Helicobacter pylori* kaynaklı mide rahatsızlıkları, laktoz intoleransı, kolon kanseri, alerjik reaksiyonlar ve yüksek kolesterol seviyeleri gibi çeşitli rahatsızlıklar üzerinde iyileştirici etkilere sahip olduklarını rapor edilmektedir [Darılmaz ve ark., 2011a; Yuksekdağ ve Aslim, 2010]. Probiyotiklerin temel özellikleri doğal olarak kalın bağırsak florasında bulunmaları, nonpatojen olmaları, teknik işlemlerle harabiyete ve mide aside ve safra asitlerine dirençli olmaları, gastrointestinal sistem duvarına tutunarak geçici bir süre intestinal epitele kolonize olarak konakçıya belirli bir fayda sağlamalarıdır [Dixit ve ark., 2013]. Laktobasiller ve bifidobakteriler, probiyotik olarak yaygın kullanılan mikroorganizmalardır [Messaoudi ve ark., 2011].

Probiyotikler bugün antibiyotiğe bağlı ishalin önlenmesinden atopik çocuklarda atopik dermatitin önlenmesine kadar çok geniş bir alanda alternatif tıp alanı olarak koruyucu ve tedavi edici amaçla kullanılmaya başlanmıştır [Gorbach, 2002]. Sepsis ve neonatal enterokolite (NEK) eğilimli prematüre ve düşük doğum ağırlıklı bebeklerde probiyotik kullanımı ile önlenebildiği ifade edilmektedir [Rinne ve ark., 2006].

Günümüzde, fermente süt ürünlerinde probiyotik olarak en yaygın olarak laktobasil cinsine ait *L. rhamnosus*, *L. reuteri* ve *L. acidophilus* türlerinden faydalanılmaktadır. Bunlardan özellikle *L. rhamnosus*, bebek ve çocuklar için geliştirilen süt ürünlerinde en çok kullanılanıdır [Mitsuoka, 1990; Lee ve ark., 1999; Gürsoy ve ark., 2005].

Çalışma kapsamında Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan ve moloküler tanımlamaları yapılmış farklı türlere ait 15 adet laktobasil suşlarının bazı probiyotik özellikleri araştırılmıştır.

Laktik asit, laktik asit bakterilerinin fermentasyon yolu ile ürettikleri primer üründür. Patojen bakterileri ve küfleri inhibe eden zayıf bir asittir [Yüksekdağ ve ark., 2004a; Yeniell ve ark., 2007]. Çalışmada laktobasil suşlarının asit üretimleri iki farklı besiyerinde (MRS ve SM) yüzde olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, skim milk besiyerinde üretilen yüzde laktik asit miktarı MRS besiyerine göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Skim milk besiyerinde asit üretiminin daha yüksek bulunmasının nedeninin, besiyerinin bileşiminde bulunan laktozdan kaynaklandığı düşünülmektedir. Sonuçlara göre skim milk besiyerinde laktobasilerin asit üretimi %1,05 (*L. casei* LB83) ile %2,79 (*L. casei* LB74) arasında değişirken ve bu oran MRS besiyerinde %0,45 (*L. casei* LB83) ile %1,50 (*L. casei* LB74) arasında değişmektedir. Çalışmada, yüksek oranda asit üreten suşların daha düşük besiyeri pH'sına sahip olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). Araştırmacılar da, asit üretimi ve besiyeri pH değerleri arasında ters bir ilişki olduğunu bildirmektedirler [Yüksekdağ ve ark., 2004b; Young Yoon ve ark., 2003].

Vajinadan izole edilen 22 laktobasil suşunun MRS besiyerinde yüzde asitlik oranı %0,068-2,48 olduğu [Aroutcheva ve ark., 2001], bir başka çalışmada yoğurttan izole edilmiş *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* (14 suş) kültürlerinin MRS besiyerinde yüzde asitlik miktarı %0,03-0,10 olduğu rapor edilmiştir [Beyatli ve ark., 2007]. 2004 yılında kefirde izole edilen laktobasilsuşlarının asitlik miktarı skim milk besiyerinde %2,3-9,9 arasında belirlenmiştir [Yüksekdağ ve ark., 2004a]. Bebeklerin dışkılarından izole edilen laktobasillerin asit üretimi ile ilgili literatür bilgisine raslanılmamıştır. Bu çalışma bu konu ile ilgili yapılan ilk çalışma olması bakımından dikkat çekicidir. Yapılan çalışmalarda, süt ve süt ürünlerinden izole edilen laktobasillerin SM'de daha yüksek laktik asit ürettiği, vajenden izole edilen suşların ise MRS besiyerinde daha yüksek laktik asit ürettikleri gözlenmiştir. Buda bize izolasyon kaynağının ve besi yerlerinde bulunan kimyasal maddelerin, üretilen laktik asit miktarını etkilediğini göstermektedir.

Laktik asit bakterilerinin oluşturduğu laktik asidin yanında, hidrojen peroksit ve bakteriyosin gibi antimikrobiyal maddelerinde florayı korumada önemli etkileri mevcuttur [Yüksekdağ ve ark., 2004a]. Çalışmada, *L. casei* LB17 suşu en düşük

hidrojen peroksit üretimlerine (0,68 µg/mL)sahipken, *L. casei* LB74suşunun ise en yüksek hidrojen peroksit üretimine sahip (3,83 µg/mL) olduğu bulunmuştur.

Pridmore ve ark., [2008] yılında insan bağırsağından izole edilmiş 11 *Lactobacillus* spp. suşlarının hidrojen peroksit üretim miktarı 617-1400 µg/mL belirlerken, Millsap ve ark., [1996] insan idrarından izole ettikleri suşların ürettikleri H₂O₂ miktarları 25-75 µg/mL arasında olduğunu bildirmişlerdir. Sabir ve ark., [2010] kefirde izole edilmiş laktobasil suşlarında H₂O₂ miktarını 0,45-3,18 µg/mL arasında olduğunu rapor etmişlerdir. Bebeklerin dışkılarından izole edilen laktobasillerin H₂O₂ üretimi ile ilgili literatür bilgisine rastlanılmamıştır. Aynı cinse aitte dahi olsalar, farklı suşların ürettikleri H₂O₂ miktarlarının farklılığı, oksidoredüktazlardan laktat dehidrogenaz enziminin aktivitesinin farklılığından kaynaklandığı bilinmektedir ve bu enzimin aktivitesinin de bakterinin bulunduğu ortamdan etkilendiği bildirilmektedir [Reinheimer ve ark., 1990]. İnsan kaynaklı izolatlarda hidrojen peroksit üretimlerinin yüksek olduğu ancak süt ürünleri kaynaklı izolatlarda ise hidrojen peroksit üretiminin daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada suşların diğer insan kaynaklı izolatlardan daha düşük hidrojen peroksit üretimine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu da, izolatların laktat dehidrogenaz enzim aktivitelerinin düşük olduğunu düşündürmüştür.

Doğal insan florasında bulunan laktik asit bakterilerinin üstün özelliklere sahip bazı suşlarının probiyotik olarak kullanılması ile hastalıkların tedavisinde antibiyotiklere alternatif olması düşünülmektedir. Araştırmacılar probiyotiklerin sadece tedavi amaçlı olmayıp, bazı enfeksiyonlar için koruyucu amaçlı da kullanılabileceğini bildirmişlerdir [Madureira ve ark., 2011]. Normal mikrofloranın antibiyotik tedavilerinden etkilenmemesi için seçilecek suşların antibiyotiklere dirençli olması önemli bir kriterdir. Antibiyotik uygulamalar sırasında probiyotikler kullanılarak mikrofloranın koruyuculuğunun devam edebileceği vurgulanmaktadır (Xiao ve ark., 2010).

Antibiyotik kullanımına bağlı gelişen ishaller, bozulan konak florasının düzeltilmesi gibi farklı amaçlarla kullanılan probiyotiklerin hastada tedavi amacı ile kullanılan

antibiyotiklere dirençli olması gerekmektedir [Simadibrata ve ark., 2013]. Antibiyotik ilişkili ishal, antibiyotik kullanımı sırasında karşılaşılan önemli yan etkilerden biridir. Her yıl çok büyük sayıda çocuğun antibiyotik kullanması nedeniyle buna bağlı oluşabilecek ishallerin bir kısmının önlenmesi önem taşımaktadır. Çeşitli meta analizlerde antibiyotik ilişkili ishalin tedavi ve önlenmesinde probiyotiklerin yararlı etkileri ortaya konulmuştur [Meier ve Steuerwald, 2005]. Arvola ve arkadaşları, Finlandiya’da ortalama yaşı 4,5 olan ve üst solunum yolu enfeksiyonu nedeni ile antibiyotik alan çocukların bir grubuna günde iki kez *Lactobacillus* GG vermişler ve ishal sıklığında kontrol grubuna göre belirgin azalma saptamışlardır (%5’karşın %16) [Arvola ve ark., 1999]. Ülkemizde yapılan bir başka araştırmada, 1-5 yaş grubunda, sulbaktam ampilisin veya azitromisin almakta olan 465 çocuk üzerinde yürütülen bir çalışmada, tek başına antibiyotik alan grupta ishal görülme sıklığı %16, antibiyotik ile birlikte *Saccharomyces boulardii* alan grupta %6 olarak saptanmıştır [Erdeve ve ark., 2005].

Bu tez çalışmasında, bakterilerin klinikte yaygın olarak kullanılan glikopeptid yapısındaki vankomisin ve aminoglikozit yapısındaki streptomisin antibiyotiklerine dirençli bulunmuştur. Glikopeptid grubundan teikoplanin (TEC) antibiyotiği, aerop ve anaerop Gram pozitif bakterilere etkilidir ve bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar için klinik uygulamalarda kullanılmaktadır (Ustaçelebi, 1999). Bu araştırmada, teikoplanin antibiyotiğine bakterilerin %98’inin dirençli olduğu bulunmuştur. Özellikle klinik uygulamalarda sıklıkla kullanılan glikopeptid yapısındaki antibiyotiklere bu çalışmada kullanılan bakterilerin dirençli olması, seçilecek bakterilerin probiyotik olarak kullanımlarını ön plana çıkaracaktır.

Probiyotiklerin güvenilirliği ile ilgili çalışmalar, antibiyotiklerin direnç genlerinin transfer potansiyeli ve lokalizasyonu üzerinde odaklanmıştır. Probiyotiklerin spesifik antibiyotiklere dirençli olması arzu edilmektedir. Araştırılan probiyotik bakteriler arasında kloramfenikol ve eritromisine direnç genlerine sahip suşların, bu genlerin transfer edilmemesi bakımından, probiyotik seçiminde çok önemli ve yararlı olduğu bildirilmektedir [Temmerman ve ark, 2003]. Birçok durumda antibiyotiksel dirençlilik transfer edilmemektedir, ancak organizmanın doğasında bulunan direnç

genlerinin transfer karakteristiğini temsil etmektedir. Probiyotiklerin en önemli gereksinimleri, onların direnç genlerini taşıyan hareketli öğeleri barındırmamalarıdır. Bazı araştırmacılar, doğası gereği vankomisin'e direnç genini taşıyan laktobasillerin güvenilir bir şekilde probiyotik olarak kullanılabilmesini ve bu genin diğer türlere aktarıldığını göstermemiştir [Gotcheva ve ark., 2002]. Bu çalışmada da kullanılan bakterilerin hepsinin vankomisine dirençli olmalarından dolayı, potansiyel probiyotik adaylar olarak değerlendirilebileceklerdir.

Probiyotik bakteriler bağırsak yüzeyine yerleşerek istenmeyen bakterilerin tutunmasını engellemekte ve ürettikleri antimikrobiyal aktiviteye sahip organik moleküller (laktik, asetik, formik, propiyonik asit) ve antimikrobiyal bileşikler (hidrojen peroksit, diasetil ve bakteriyosin) bu bakterilerin çoğalmalarını kontrol altına almaktadırlar [Mohammadi ve ark., 2013]. Çalışmada, laktobasil cinsine ait suşların çocuklarda hastalığa sebep olan patojen bakteriler (*Escherichia coli* ATCC 11229, *Salmonella typhimurium* MU 80, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) üzerine inhibisyon etkileri belirlenmiştir. Buna göre suşların %100'ü *S. enteritidis* ATCC 13076, *S. typhimurium* MU 80 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivite göstermişlerdir. *E. coli* ATCC 11229 test bakterisine karşı suşların %93,3'ü, *L. monocytogenes* ATCC 7644'e karşı suşların % 86,6'sı ve *S. aureus* 25923'a karşı ise suşların %26,6'ü inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada antimikrobiyal etki gösteren suşların bu etkiyi ürettikleri laktik asit, hidrojen peroksit veya bakteriyosin ile gösterdikleri düşünülmektedir. Genel olarak, yüzde asit ve hidrojen peroksit üretimleri yüksek olan *L. casei* LB74 ve LB61 kodlu suşların tüm patojen bakterilere karşı (LB 74 suşu için, *L. monocytogenes* hariç) inhibisyon etkisi göstermişlerdir.

Anne sütünden izole edilen 5 laktobasil suşlarında *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria* spp. ve *Clostridium* spp. patojen bakterilerinin antimikrobiyal etkileri incelenmiş ve *L. gasseri* CECT5715 suşunun *Listeria* ve *Clostridium* patojenlerine ve *L. gasseri* CECT5716 suşu ise *Clostridium*

spp. patojenine etki gösterdiği bildirilmiştir [Olivares ve ark., 2006]. Yapılan bir başka çalışmada bebeklerin dışkılarından izole edilen 5 laktobasil suşlarında çocuklarda hastalığa sebep olan patojen bakteriler *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Listeria monocytogeness* ve *Staphylococcus aureu* üzerinde laktobasillerin etkisi incelenmiş ve beş bebek patojenin üzerine laktobasillerin ürettiklerinin çalışmaya olduğu rapor edilmiştir [Nawaz ve ark., 2011].

Patojen bakterilere karşı kontrolsüz antibiyotik kullanımı ile antibiyotik dirençlilikleri fazlalaşmıştır. Bu nedenle patojen mikroorganizmalarla mücadelede antibiyotik kullanımı yerine, daha çok doğal gıda koruyucusu olan probiyotiklerin kullanımı önerilmektedir. Bu çalışmada, yüksek asit, hidrojen peroksit ve patojen bakterilerin gelişimini inhibe etme özelliği gösteren suşların (*L. casei* LB 74, LB 61, LB 64, *L. brevis* LB63) probiyotik olarak kullanımı ile çocuklarda enfeksiyonlara neden olabilen bazı patojen bakterilerin kontrollü bir şekilde ortamdaki uzaklaştırılmasında kullanılabilir.

EPS'ler bakterinin olumsuz çevre şartlarından korunmasını ve çeşitli yüzeylere tutunmasını sağlamaktadır. Polisakkaritler, üretici suşlar tarafından katabolize edilemediklerinden enerji kaynağı değildirler, buna karşılık mikroorganizmayı veya ortamı kurumaya karşı korur, zararlı veya düşman bir ortamdaki uzaklaştırırlar [Şengül ve ark., 2006]. EPS'nin bakteriyi koruma özelliği ayrıca antibiyotiklere karşıda fiziksel bir koruyuculuk şeklinde de ortaya çıkmaktadır [Darılmaz ve ark., 2011a]. Laktobasil cinsi bakterilerin oluşturdukları EPS, epitel doku ile bağırsak florasında bulunan bakteriler arasında gerçek bir bağ meydana getirirler ve böylece EPS üretimine sahip suşların yüksek yapışma kapasitesine sahip olacağı ifade edilmektedir. Bu yapışkan polimer sayesinde laktobasiller birbirine bağlanabilecektir [Raus-Madiedo ve ark., 2006; Darılmaz ve Beyatli, 2012]. Bu sebeplerden dolayı, yüksek EPS üretimine sahip olan bakterilerin probiyotik olarak uygun olacağı vurgulanmaktadır.

Bu tez çalışmasında en yüksek EPS üretimi 425,16mg/L ile *L. casei* LB74 suşunda tespit edilirken, en düşük EPS üretimi 142,99 mg/L ile *L. casei* LB17 suşunda

belirlenmiştir. Yuksekdağ ve Aslim, [2008] yoğurt kaynaklı, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (B3, G12) ve *Streptococcus thermophilus* (W22) suşlarının EPS üretimleri incelenmiş ve EPS miktarını *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarında 116 -255 mg/L ve *S. thermophilus* suşlarında ise 32-174 mg/L olarak rapor etmişlerdir. Bir başka çalışmada kefirde izole edilmiş *Lactococcus* spp. ve *Pediococcus* spp suşlarının EPS üretim miktarının 173-378 mg/L arasında değiştiği bildirilmiştir [Sabir ve ark., 2010]. Halit, vajen kaynaklı 57 adet *Lactobacillus* spp. suşlarının EPS üretim kapasitelerini belirlediği yüksek lisans çalışmasında, suşların ürettikleri EPS miktarının 20-368 mg/L arasında değişiklik gösterdiğini bildirmiştir [Halit, 2007]. Yapılan çalışmalarda, insan kaynaklı izolatların EPS üretiminin, süt ve süt ürünleri kaynaklı izolatların ürettiği EPS miktarından fazla olduğu da dikkat çekicidir. Bu çalışmada da, kullanılan bakterilerin EPS üretim miktarlarının diğer çalışmalardan yüksek olduğu görülmektedir. Çalışmalarda elde edilen değerlere göre EPS üretimlerinin türler ve hatta suşlar arasında farklılık bulunmaktadır. Araştırmacılar bunun nedeninin izolasyon kaynağı, fermantasyon şartları (sıcaklık, inkübasyon, süre ve pH) ve besiyeri kompozisyonunun (karbon ve nitrojen kaynağı) farklı olmasından dolayı olduğunu ifade etmektedirler [Desai ve ark., 2006; Raus-Madiedo ve ark., 2006; Yuksekdag ve Aslim, 2008].

Bağırsak ekosisteminin fizyolojik dengesi hastalık, yaşlılık, antibiyotik veya ilaç kullanımı, diyet alışkanlıklarının değiştirilmesi, iklim koşullarında meydana gelen değişimler ve çevresel toksik maddeler gibi faktörlerden doğrudan veya dolaylı olarak etkilenebilmektedir [Çakır, 2002]. Bağırsak sisteminin dengesinde meydana gelen bu düzensizlikler sonucu bağırsak mikroflorasının dengesi bozulur ve faydalı mikroorganizma sayısında düşüşler başlar [Krasaekoopt ve ark., 2003; Sultana ve ark., 2000]. Yapılan çalışmalara göre, bu mikroflora dengesizliğinin dışarıdan yapılacak mikroorganizma takviyesi ile aşılabileceği ifade edilmektedir. Faydalı bakteriler yoğurt gibi fermente süt ürünlerine eklenerek, probiyotik ürün olarak piyasaya sunulmaktadır [Yücesan, 2002; Çakır, 2002].

Dışarıdan vücuda verilen bu yararlı mikroorganizmaların faydalı olabilmesi için midedeki düşük asitlik ve bağırsaktaki safra tuzu gibi öldürücü etkiler karşısında

canlılıklarını muhafaza edebilmelidirler [Alp ve Aslim, 2010]. Sonuçta faydalı mikroorganizma bağırsağa ulaştığında canlı ve belli bir sayının üzerinde kalabilmelidir [Darılmaz ve Beyatlı, 2011].

Bu çalışmada, laktobasillerin farklı pH'larda asit dirençliliği incelenmiştir. Suşların, spektrofotometrik olarak hücre yoğunlukları ve %canlılıkları belirlenmiştir. Bakterilerin buldukları ortamda asitlik miktarının artması nedeni ile hücre yoğunluğunda ve %canlılıkta azalma gözlenmiştir. pH 2'deki %canlılık değerleri 5,94 ile 12,93 arasında değişirken pH 3'de %canlılık değerleri %7,42 ile 16,91 arasında, pH=4'de ise %canlılık değerleri %31,68-97,46 arasında değiştiği belirlenmiştir. pH 5'de kontrol grubuna göre çok fazla bir düşüş olmamakla birlikte suşların % canlılıkları %93,50-91,09 olarak belirlenmiştir. *L. casei*LB65, LB49 ve LB19 suşları pH 2 gibi çok düşük asitlik derecelerinde bile %12'nin üzerinde canlılık oranı göstermişlerdir.

Sabir ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmada kefirde izole ettikleri *Lactobacillus* ve *Pediococcus* suşlarının pH 1; 1,5; 2; 2,5; 3,5'teki hücre yoğunlukları ölçülmüş ve asitlik miktarı arttıkça hücre yoğunluğunda azalma gözlenmiştir. pH 1'de suşların asit dirençliliği değerlendirildiğinde en yüksek bakteri yoğunluğunu *P. acidilactici* ZN10P (5,2 Log CFU/mL) suşunda tespit etmişler ve *L. acidophilus* Z1L, *L. casei* Z7L, *P. dextrinicus* ZN1P ve *L. lactis* Z3S suşlarında ise bu pH değerinde canlı kalamadıklarını bildirmişlerdir. Millette ve arkadaşları laktobasil cinsine ait 5 suşun pH 1,5; 2; 2,5; 3 gibi asidik ortamlarda probiyotik özelliklerini çalışmışlar ve pH 1,5'te canlılık oranının düştüğünü göstermişlerdir [Millette ve ark., 2006]. Bir başka çalışmada, sucuk'tan izole edilmiş *Pediococcus* spp. bakterilerin farklı pH'larda hücre yoğunlukları incelenmiş ve pH 1'de en düşük hücre yoğunluğu olduğunu rapor edilmiştir [Yuksekdag ve Aslim, 2010]. Ağız yolu ile alınan probiyotikler bağırsak bölgesine ulaşmadan önce midenin asitli ortamı ile karşı karşıya kalmaktadırlar. Bu sebeple, potansiyel probiyotik adaylarının aside direncinin yüksek olmasının, asidik bir ortam olan midede canlılığını kaybetmeden bağırsak sistemine geçerek, burada kolonizasyonu için avantaj olabileceği düşünülmektedir. Genel olarak bu çalışmada kullanılan bakterilerin pH 2 gibi düşük

bir pH değerinde bile canlı kalabilmelerinden dolayı, onların potansiyel probiyotik adaylar olabileceklerini düşündürmektedir.

Safra toleransı da probiyotiklerin seçiminde kullanılan önemli kriterlerden bir diğeridir. Yağları parçalayarak bunların bağırsaklardan emilimlerine yardımcı olmak üzere karaciğerden ince bağırsağa salgılanan safra, bakterilerin büyük oranda lipit ve yağ asidi içeren hücre membranlarına zarar vermek suretiyle inhibitör etkisi yapmaktadır [Dunne ve ark., 1999; Darılmaz ve Beyatlı, 2011]. Bu sebeple probiyotik olarak kullanılacak bakterilerin bağırsaklarda fonksiyon gösterebilmeleri için safraya karşı dirençli olmaları gerekmektedir [Succi ve ark., 2005; Darılmaz ve Beyatlı, 2011]. Bununla beraber, insan kullanımı için probiyotiklerin seçimindeki safra toleransı çalışmalarında % 0,15 ve % 0,30 konsantrasyonlarında safranın kullanılması önerilmektedir [Huang ve Adams, 2004]. Yapılan çalışmalarda, insandaki safra konsantrasyonuna yakın bir değer olmasından dolayı safraya dirençli olan suşları belirlemek için özellikle % 0,30' lük safra konsantrasyonunun kritik bir değer olduğu bildirilmiştir [Brashears ve ark., 2003, Lin ve ark., 2006].

Bu çalışmada, *Lactobacillus* suşlarının %0,06, %0,15 ve %0,30'luk safra konsantrasyonlarında dirençlilikleri ve %canlılık değerleri belirlenmiştir. Sonuçlara göre safra yoğunluğu arttıkça bakteri yoğunluğunda azalma gözlenmiştir. %0,06 safra konsantrasyonunda en yüksek canlılık *L. casei* LB74 (%99) suşunda, %0,15 safra konsantrasyonunda en yüksek canlılık *L. casei* LB17 (%98,46) suşunda ve %0,30safra konsantrasyonunda ise en yüksek canlılık *L. casei* LB74 (%31,50) suşunda gözlenmiştir. Laktobasiller arasında safraya karşı en dirençli suşların *L. casei* LB74, *L. casei* LB61, *L. casei* LB64 ve *L. brevis* LB63 olduğu belirlenmiştir. Bu suşların yüzde asit, hidrojen peroksit, EPS üretimleri ve antimikrobiyal aktivitelerinin de yüksek olması dikkat çekicidir.

Yapılan bir çalışmada asitlik ve safra tuzlarına direnç bakımından ; *P. acidilactici* S1, *S. salivarius* subsp. *thermophilus* FYC1'in asitliğe, *B. longum* PBC1 ve *L. rhamnosus* UCP1'in safra tuzlarına, *C. glutamicum* R17 ve *L. rhamnosus* UCP1'in ise hem asitlik hem de safra tuzlarına karşı dirençli oldukları bildirilmiştir [Çakır,

2004]. Koozeh peynirden izole edilen *L. plantarum*, *L. casei* ve *L. delbruecki* türlerinin %0,30 safra konsantrasyonunda çalışılmış ve *plantarum* ve *casei*'dedirençlik gözlenmiştir [Hassanzadazar ve ark., 2012]. Ayrıca Sabir ve arkadaşları, laktobasil suşlarının % 0,15 konsantrasyonundaki safrayı % 69–94 ve % 0,30 konsantrasyonundaki safrayı % 72–92 arasında değişen oranlarda tolere ettikleri belirlenmiştir [Sabir ve ark., 2010]. Alp ve Aslim bebeklerin dışkısından ve anne sütünden izole edilmiş 31 bifidobakter üzerinde %0,15 ve %0,30 safra konsantrasyonunda çalışılmışlar ve suşlarının % 0,15 konsantrasyonundaki safrayı % 31,93–88,65 ve % 0,30 konsantrasyonundaki safrayı % 12,35–80,66 arasında oranlarda tolere edebildiklerini belirlenmiştir [Alp ve Aslim, 2010]. Elde edilen verilere göre, laktobasil cinsine ait farklı suşların asit ve safraya olan dirençliliklerinin literatür taramalarında belirlenen laktobasillere göre düşük olduğu tespit edilmiştir.

Bakterilerin agregasyon özelliğine sahip olması bulunduğu hücrelere tutunma ve dominant olarak kolonize olmasını sağlayacağından özellikle probiyotik açıdan önemli bir kriterdir. Laktik asit bakterileri agregasyon özelliği nedeniyle bulunduğu yüzeye ve birbirlerine yapışarak biyolojik bir bariyer oluştururlar [Vikova ve ark., 2008]. Laktobasillerin bağırsak florasını düzenlenmesi için bağırsak epiteline kolonize olabilmesi gerekmektedir. Bu amaçla bu çalışmada, yüksek EPS üretimine sahip olan *Lactobacillus casei* LB74 ve *Lactobacillus casei* LB61 suşlarının agregasyon yetenekleri belirlenmiştir.

Collado ve arkadaşları, *L.rhamnosus*GG, LC-705 ve *L.fermentum*ME-3 (<%25, 20 saatlik inübasyon 20°C' de) türlerini yüksek otoagregre olan türler olarak bildirirken, *B. longum* 46 (%8,9) ve *B. lactis* 420 (%5) türlerini de en düşük otoagregre olan türler olarak ifade etmektedirler. Çalıştıkları 12 adet türden 9' u 37°C' de yüksek otoagregasyon (%28,8-63,2) göstermiştir [Collado ve ark., 2008]. Aslim ve ark., [2007] *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarının otoagregasyonu %45- 93 arasında, Ekmekçi ve ark., [2009] vajinadan izole etikleri 28 adet *Lactobacillus* spp. suşlarının 37 °C' de otoagregasyonunun %21 ile 97 arasında olduğunu rapor etmişlerdir. Başka bir çalışmada kefirde izole edilen *Lactobacillus* spp. *Lactococcus*

spp.ve*Pediococcus* spp.suşlarının otoagregasyon oranı %29-88 arasında deęiştiiği bildirilmiştiiir [Sabir ve ark., 2010]. Bu çalıřmada ise, bakterilerin otoagregasyon oranları %28,91 (*L. casei* LB74) ve %20,5 (*L. casei* LB61) olarak diđer çalıřmalardan daha dűřuk bulunmuřtur. Bebeklerin dıřkisından izole edilen laktobasillerin otoagregasyon yeteneęi ile ilgili literatűr bigisine rastlanılmamıřtır. Bu alıřma bu konu ile ilgili yapılan ilk çalıřma olması bakımından dikat çekicidir. alıřmalar karřılařtırıldıęında, agregasyon yeteneęinin tűre ve suřa gűre deęiřken olduęunu gűrűlmektedir. EPS űretimi yűksek olan *L. casei* LB74 suřunun otoagregasyonununda yűksek olduęu belirlenmiřtir. Elde edilen bu sonuçlar, űzellikle EPS' nin agregasyonu artırdıęını ve yűksek EPS űreten ve otoagregasyon gűsteren bu suřun epitel yűzeylere daha yűksek oranda kolonize olabileceęi dűřűndűrműřtir.

Agregasyon yeteneęinde yűksek EPS űretiminin yanında bařka faktűrlerin de etkili olduęu dűřűnűlmektedir. Laktobasilsuřları arasındaki otoagregasyon farklılıklarının űreme ortamı ve sıcaklıęı, yűzey hidrofobisitesi ve yűkű, ortamın pH'sı, bakteri hűcre duvarındaki lipoteikoik asit ve diđer yűzey polimerlerin (glikoprotein, polisakkaritler, lipoprotein, glikolipid, protein gibi) de etkili olduęu bildirilmiřtir. Yine bakteriyel agregasyondan Agregasyon Promoting Faktűr (APF) olarak adlandırılan bir proteininde sorumlu olduęu rapor edilmektedir [Boris ve ark.,1997]. Bu çalıřmada, suřların farklı agregasyon gűstermelerinin sebebinin APF olabileceęi de dűřűnűlműřtir.

Koagregasyon űzellięinden dolayı laktik asit bakterilerinin bulunduğu ekosisteme giren patojen bakterilere yapıřarak onları etkisiz hale getirmekte, bűylece olası bir enfeksiyonu ve bakterinin toksik etkisini engelleyebilmektedir [Lang ve ark., 2010].

Çalıřmada, EPS űretimi yűksek olan *L. casei* LB74 ve *L. casei* LB61 suřlarının, *Escherichia coli* ATCC 11229 *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 bakterileri ile koagregasyon denemeleri yapılmıřtır. *L. casei* LB74suřunun denene iki pataojen (*E. coli* ATCC 11229-%14,41 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644-%19,99) ile yűksek oranda koagreg olduęu tespit

edilirken *L. casei* LB61 suşu *S. enteritidis* ATCC 13076 bakterisi ile yüksek koagregasyon (%31,08) gösterdiği belirlenmiştir.

12 adet probiyotik bakterin patojen bakteriler ile koagregasyonun değerlendirildiği bir çalışmada, koagregasyon yüzdesinin suşa, inkübasyon süresine ve koşullarına bağlı olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, en yüksek koagregasyonun *Bacillus vulgatus* ile *L. rhamnosus* LC-705 (%29,7) ve *L. fermentum* ME-3 (%25,9) suşları arasında olduğunu rapor etmişlerdir. *Clostridium histolyticum* ile yüksek koagregasyon *L. rhamnosus* LC-705 (%24,6), *L. fermentum* ME-3 (%22,7) ve *L. acidophilus* NCFC (%25,5) suşlarında belirlenmiştir [Collado ve ark., 2008]. Bebeklerin dışkılarından izole edilen laktobasillerin koagregasyon yeteneği ile ilgili literatür bigisine rastlanılmamıştır. Bu çalışma bu konu ile ilgili yapılan ilk çalışma olması bakımından dikat çekicidir. Bu çalışmalar ile karşılaştırıldığında çalışmada kullanılan suşların koagregasyonlarının digger çalışmalarda da bulunan sonuçlara yakın olduğu görülmektedir.

Polar özellik taşımayan moleküllerin sıvı ortamda kendiliğinden bir araya gelme eğilimi, hidrofobik etkileşimdir. Bu etkileşimin arkasındaki itici güç, hidrofobik grupların etrafını çevreleyen su moleküllerinin yer değiştirmesinden kaynaklanan entropi artışıdır. Hidrofobik etkileşimlerin biyolojik sistemlerdeki en büyük önemi, mikroorganizmaların yüzeylere tutunmasını sağlamasıdır [Grover ve ark., 2012]. Probiyotiklerin epitelyum yüzeylere tutunarak kolonize olmaları önemli bir kriterdir. Hidrofobik özelliğe sahip olan probiyotik mikroorganizmaların epitel yüzeylere daha iyi tutundukları ifade edilmektedir [Salminen ve ark., 2010]. Bu çalışmada, bakterilerin farklı maddelere tutunması, hücre tutunması ile pozitif ilişkisi olan hidrofobisite özelliği ile belirlenmiştir. EPS üretim kapasitesi yüksek olan *L. casei* LB74 ve *L. casei* LB61 suşlarının nötral çözücü olan p-ksilene ve bazik çözücü olan etil asetata ilgisinin olmadığı tespit edilirken, asidik çözücü olan kloroforma (sırasıyla, %67,05, %45,33) ilgisinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum, kullanılan bakterilerin yüzey yapılarının kompleks olduğunu göstermiştir.

Ahumada ve arkadaşları, dıştan izole ettikleri 13 adet laktobasil suşunun hemen hepsinin apolar çözücü olan p-ksilene zayıf affinite (%0-35) gösterdiğini, tükürükten izole edilen 17 adet laktobasil izolatından dokuzunun bazik çözücü olan etil asetata (%0-35) ve asidik çözücü olan kloroforma (%0-35) da zayıf affinite gösterdiklerini bildirmişlerdir [Ahumada ve ark., 2001]. Pelletier ve arkadaşları [1997] ise bu araştırmacılarından farklı olarak kullandıkları *L. casei* ve *L. paracasei* suşlarının kloroforma yüksek affinite, etil asetata ise düşük affinite gösterdiklerini tespit etmişlerdir. Bu çalışma bulunan sonuçlar ile tez çalışmasındaki sonuçlar örtüşmektedir.

Belirli hormonların ve vitaminlerin öncül maddesi, hücre membranlarının ve sinir hücrelerinin de önemli bir bileşeni olan kolesterol, insan vücudundaki birçok fonksiyonun gerçekleşebilmesi için gereklidir. Ancak kandaki yüksek kolesterol seviyesi koroner kalp hastalığı için bir risk faktörü teşkil etmektedir [Parvez ve ark., 2006; Tok ve Aslim, 2010]. Batılı ülkelerdeki en önemli ölüm nedenlerinden biri yüksek kolesterol ile bağlantılı olan kalp-damar hastalıklarıdır. Özellikle kalp-damar hastalıklarının önlenmesi için serum kolesterol seviyelerinin düşürülmesi büyük önem taşımaktadır [Lim ve ark., 2004]. Kolesterol emilimi insan vücudunda temel olarak ince bağırsaklarda gerçekleştiğinden dolayı bu bölgede kolesterol giderimi yeteneğine sahip belirli laktobasil cinsi bakterilerin gelişiminin serum kolesterol seviyelerinin kontrol edilmesinde etkili olabileceği ifade edilmektedir [Tok ve Aslim, 2010]. Probiyotiklerin serum kolesterol düzeyinin düşürülmesinde alternatif adaylar olabilecekleri ile ilgili düşünceler gün geçtikçe artmaktadır.

Probiyotik olarak kullanılan bakterilerin serum kolesterol seviyesini azaltma mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte bu konuda çok fazla çalışma yapılmaktadır. Kolesterol konsantrasyonunun azaltabilmesi ile ilgili mekanizmalar arasında, bakteriler tarafından kolesterolün asimilasyonu, kolesterolün bakterinin hücre duvarına bağlanması veya hücre zarının yapısına katılması, kolesterolün bağırsaklardan emilemeyen bir molekül olan koprostanol molekülüne dönüştürülmesi ve safra tuzlarının enzimatik dekonjugasyonu bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar, kolesterolün ve dekonjugasyon neticesinde açığa çıkan serbest safra asitlerinin

bakteriyel hücre duvarına bağlanmasında, bakteri hücresi tarafından üretilen ekzopolisakkaritlerin (EPS) de önemli bir role sahip olabileceğini ileri sürmektedirler [Nakajima ve ark., 1992; Tok ve Aslim, 2010].

Vücuttaki kolesterol yıkımının büyük kısmı karaciğerdeki safra asidi senteziyle olur. İnsanlarda her gün yaklaşık olarak 500 mg kolesterol safra asitlerine dönüştürülür ve safra içinde uzaklaştırılır. Kolesterolün, vücuttan atılması için izlenen en önemli yol safra içerisine salgılanmasıdır. Serbest kolesterol, sulu çözeltilerde neredeyse hiç çözünmez, fakat safrada, safra asitleri ve lesitin gibi lipidler vasıtasıyla çözünebilir hale gelir [Champe ve Harvey, 1997]. İnsandaki safra konsantrasyonuna yakın bir değer olmasından dolayı özellikle %0,30'lük safra konsantrasyonunun kritik bir değer olduğu bildirilmiştir. Laktobasiller ve bifidobakteriler ile yapılan çeşitli deneyler bu bakterilerin belirli suşlarının, safra tuzları varlığında, kolesterolü asimile edebilme yeteneğine sahip olduğunu kanıtlamıştır [Usman, 1999; Lye ve ark., 2010].

Çalışmada kullanılan her iki suşunda (LB74/ LB61) safra içermeyen ve %0,06; %0,15 ve %0,30 oranında safra içeren besiortamlarında kolesterolü belirli miktarlarda uzaklaştırabildiği belirlenmiştir. Her iki suşunda en az kolesterol giderimini safra içermeyen besiortamında, en fazla kolesterol giderimi ise %0,30 oranında safra içeren besiortamında gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. En yüksek kolesterol giderimi *L. casei* LB 74 suşunda %0,30 safra içeren besi ortamında %66 olarak tespit edilmiştir. İnsan bağırsağındaki safra konsantrasyonuna yakın değer olan 0,30 oranında safra içeren besiortamında kolesterol giderimi, safrasız besiortamından ve diğer konsantrasyonlardan daha yüksek bulunması bu suşların probiyotik olarak kullanılabilirliğini ön plana çıkarmaktadır.

Gilliland ve arkadaşları, *L. acidophilus* tarafından kolesterol giderimini belirlemek üzere yaptıkları benzer bir çalışmada safra konsantrasyonunun bakteriler tarafından kolesterol giderimini üzerinde etkili olduğu ve bakterilerin sadece safra varlığında kolesterol giderimi daha iyi gerçekleştirebildiklerini bildirmişlerdir. Çalışmada besiortamındaki safra konsantrasyonu %0,0'dan %0,5'e doğru yükseldikçe asimile olan kolesterol miktarının da arttığı ortaya konulmuştur [Gilliland ve ark.,1985].

%0,0 ve %0,3 oranında safra içeren besiortamlarında geliştirilen farklı laktik asit bakterilerinin kolesterol giderimi kapasitelerinin araştırıldığı bir diğer çalışmanın sonucunda, test edilen suşların safra varlığına bağlı olmaksızın besiortamındaki kolesterolü %0-%65,9 arasında değişen oranlarda uzaklaştırabildikleri bildirilmiştir. Ayrıca, suşların safra içermeyen besiortamında da kolesterolü giderebildikleri rapor edilmiştir [Lim ve ark., 2004]. Yapılan bu çalışmada da test edilen iki suşun da safra içermeyen besiortamında dahi kolesterol giderimini gerçekleştirebildikleri belirlenmiştir. Ancak %0,30 oranında safra içeren ortamdaki kolesterol giderimi daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Bu durumun safranın yağların üzerindeki çözücü etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Nakajima ve arkadaşları EPS üreten laktik asit bakterileri ile fermente edilmiş sütün kolesterol düşürücü etkisini belirlemek üzere yaptıkları bir çalışma da, fermente edilmiş süt tüketiminin, kobaylardaki serum kolesterol seviyelerini belirgin bir şekilde düşürdüğünü rapor etmişlerdir. Oysa EPS üretmeyen suş ile fermente edilmiş sütün tüketiminin kobayların kolesterol seviyelerini düşürmediği bildirmişlerdir. Araştırmacılar tarafından bakteriyel ekzopolisakkaritlerin kolesterolü bağlayabilme özelliğine sahip lifli gıdalara benzer bir etki göstererek kolesterolün bağırsaklardan emilimine engel olduğu ve böylece serum kolesterol seviyelerinin düşmesini sağladığı öne sürülmüştür [Nakajima ve ark., 1992]. Bu tez çalışmasında da yüksek EPS üretimine sahip olan *L. casei* LB74 suşunun kolesterol gideriminde diğer suşa göre (LB 61) yüksek olduğu dikkatimizi çekmiştir. Bakteriler tarafından üretilen ve hücre duvarına bağlı olarak bulunan ekzopolisakkaritler ile besiortamındaki kolesterol arasında gerçekleşen bir etkileşimden kaynaklanarak besiortamından kolesterol giderimi olmuş olabileceği düşünülmüştür.

Birçok araştırmacı, verimli bir probiyotik uygulaması için, bakterinin insan kaynaklı olması gerektiğini ileri sürmektedirler. Yapılan bu çalışma, Türkiye’de yaşayan bebeklerin dışkılarından izole edilen laktobasil cinsi bakterilerin birçok probiyotik özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmadır. Bu tez çalışması, Türkiye’de yaşayan ve annelerin sütü ile beslenen bebeklerinin dışkılarından izole edilen laktobasillerin

probiyotik özellikleri bakımından bilgiler verecektir. Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre suşlar tarafından üretilen EPS' nin probiyotik kullanım açısından önemli olduğunu düşünülmektedir. EPS üretimi yüksek olan birçok suşun asit, hidrojen peroksit üretimi, antimikrobiyal aktiviteleri yüksek olduğu, bununla birlikte agregasyon yetenekleri, hidrofobisite ve kolesterol giderimleri de yüksek bulunmuştur. Bakterilerin kolonizasyonunda toplumun beslenme alışkanlıkları, coğrafi koşullar ve bakteri türlerinin farklılığı gibi birçok parametrenin de etkili olduğu düşünülürse, özellikle anne sütü ile beslenen bebeklerin dışkısından izole edilmiş ve probiyotik özellikleri araştırılmış üstün nitelikli suşların özellikle bu bölgedeki insanlarda probiyotik uygulamalarda kullanılması ile daha verimli sonuçların alınabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışma sonucunda, *L. casei* LB74, *L. casei* LB 61 ve *L. casei* LB64 suşlarının H₂O₂, laktik asit ve EPS üretim kapasitesinin ve safra tuzu toleransının yüksek olması nedeniyle canlılığını koruyarak, bağırsaklara ulaşabileceği düşünülmektedir. EPS, agregasyon, hidrofobisite ve kolesterol giderim yetenekleri ile epitel yüzeylere daha kolay kolonize olup, patojenler üzerindeki inhibisyon etkisi sayesinde de epitel yüzeyde *E. coli* ve *Salmonella*'lar gibi patojen mikroorganizmalar için biyolojik bir bariyer oluşturabilecekleri düşünülmektedir. Bu suşların sahip oldukları bu üstün özelliklerden dolayı, hayvan denemeleri yapıldıktan sonra potansiyel probiyotik mikroorganizmalar olarak kullanılmaları önerilebilecektir. Bu bakterilerin asit direncinin az olması nedeniyle gelecek çalışmalarda bu özelliğin kapsülleme ve başka teknik kullanılarak geliştirilmesi ile probiyotik açıdan daha verimli kültürlerin oluşturulması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Aggett, P.J., Agostini, C., Goulet, O., “European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) Committee on Nutrition. The nutritional and safety assessment of breast milk substitutes and other dietary products for infants: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition”, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 32 (3): 256–8 (2001).

Ahumada, M., del, C., Bru, E., Colloca, M.E., Lopez, M.E., Nader.Macias, M.E., “Lactobacilli isolation from dental plaque and saliva of a group of patients with caries and characterization of their surface properties”, *Anaerobe*, 7 (2): 71-77 (2001).

Akalın, S., Gönç, S., Senderya, S., “Probiyotik süt ürünleri ve prebiyotikler, VI. Süt ve Süt Ürünleri Senpozyumu (Süt Mikrobiyolojisi ve katkı maddeler), Tebliğler Kitabı” *Rebel Yayıncılık*, 29-38 (2000).

Akinterinwa, O., Cirino, P. C., “Heterologous expression of D-xylulokinase from *Pichia stipitis* enables high levels of xylitol production by engineered *Escherichia coli* growing on xylose”, *Metabolic Engineering*, 11 (1): 48-55 (2008).

Alp, G., Aslim, B., “Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium* spp. Isolated from infants feces and breast milk”, *Food Microbiology*, 16: 101–105 (2010).

Arıcı, M., Bilgin, B., Sağdıç, O., Özdemir, C., “Some characteristics of *Lactobacillus* isolates from infant faeces”, *Food Microbiology*, 21 (1): 19-24 (2004).

Aroutcheva, A., Gariti, D., “Defense factors of vaginal lactobacilli”, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 185 (2): 375-379 (2001).

Arroyo, R., Martin, V., Maldonado, A., Jimenez, E., Fernandez, L., “Treatment of Infectious Mastitis during Lactation: Antibiotics versus Oral Administration of Lactobacilli Isolated from Breast Milk”, *Clinical Infectious Diseases*, 50(12): 1551–1558 (2010).

Arvola, T., Laiho, K., Torkkeli, S., “Prophylactic *Lactobacillus* GG reduce antibiotic-associated diarrhea in children with respiratory infections”, *A randomized study pediatrics*, 104 (5): 1-64 (1999).

Aslim, B., Kilic, E., “Some probiotic properties of vaginal *Lactobacilli* isolated from healthy women”, *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 59 (4): 249-253 (2006).

Aslim, B., Onal, D., Beyatli, Y., “Factors influencing autoaggregation and aggregation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* isolated from handmade yogurt”, *Food Protection*, 70 (1): 223-227 (2007).

Bager, P., Wohlfahrt, J., Westergaard, T., “Caesarean delivery and risk of atopy and allergic disease: meta-analyses”, *Clinical and Experimental Allergy*, 38 (4): 634-42 (2008).

Banwart, G.J., “Basic Food Microbiology”, *Published by Von Nosrand Reinhold*, New York, 772-773 (1989).

Bauer, G., “*Lactobacilli* mediated control of vaginal cancer through specific reactive oxygen species interaction”, *Medical Hypotheses*, 57 (2): 252–257 (2001).

Boris, S., Suarez, J. E., and Barbes, C., “Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, vaginal isolate” , *Journal of Applied Microbiology*, 83: 413-420 (1997).

Bouzar, F., Cerning, J., Desmazeaud, M., “Expolysaccharide production in milk by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CNRZ 1187 and by two colonial variants”, *Dairy Science*, 79 (2): 205-211 (1996).

Böke, H., “*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türüne ait susların bazı probiyotik özelliklerinin belirlenmesi ve tutuklamanın bu özellikler üzerine etkisi”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 4-52 (2005).

Brashears, M. M., Jaroni, D., Trimble, J., “Isolation, selection, and characterization of lactic acid bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle”, *Food Protection*, 66 (3): 355–63 (2003).

Canbulat, Z., Özcan, T., “Bebek Mamaları ve Çocuk Ek Besinlerinde *Lactobacillus rhamnosus* GG Kullanımının Sağlık Üzerine Etkileri”, *Journal of Agricultural Faculty*, 21 (1): 69-79 (2007).

Caicedo, R.A., Schanler, R.J., Li, N., Neu, J., “The developing intestinal ecosystem: implications for the neonate”, *Pediatric Research*, 58 (4): 625-628 (2005).

Calabia, B.P., Tokiwa, Y., “Production of D-lactic acid from sugarcane molasses, sugarcane juice and sugar beet juice by *Lactobacillus delbrueckii*”, *Biotechnology Letters*, 29 (9): 1329–1332 (2007).

Cerning, J., Bouillanne, C., London, M., Desmazeaud, M., “Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria”, *Dairy Science*, 75 (3): 692-699 (1992).

Ceyhan, N., Aliç, H., “Bağırsak Mikroflorası ve Probiyotikler”, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 5 (1): 107-113(2012).

Chabot, S., Yu, H., Léséleuc, L., Cloutier, D., Van Calsteren, M.R., Lessard, M., Roy, D., Lacroix, M., Oth, D., “Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured

immunocompetent cells, and IFN-gamma in mouse splenocytes”, *Lait*, 81 (6): 683–697 (2001).

Champe, P.C., Harvey, R.A., “Biyokimya”, (Editörler; Tokullugil, A.H., Dirican, M., Ulukaya, E.) *Nobel Tip Kitabevleri*, İstanbul, 430-440 (1997).

Chen, Y.S., Liou, M.S., Ji, S.H., Yu, C.R., Pan, S.F., Yanagida, F., “Isolation and characterization of lactic acid bacteria from Yan-tsai-shin (fermented broccoli stems), a traditional fermented food in Taiwan”, *Journal of Applied Microbiology*, 115: 125--132 (2013).

Chung, H.S., Kim, Y.B., Chun, S.L., Ji, G.E., “Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria”, *Food Microbiology*, 47 (2): 25-32 (1999).

Clinical and Laboratory Standards Institute, “Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 21st Informational Supplement”, *CLSI, S21 M100-S21*, Vol. 31 No. 1 (2011).

Collado, M. C., Meriluoto, J., Salminen, S., “Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains”, *European Food Research and Technology*, 226 (5): 1065–1073 (2008).

Coppola, R., Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Salzano, G., Sorrentino, E., “Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese”, *Lait*, 85: 193-204 (2005).

Corzo, G., Gilliland, S.E., “Bile salt hydrolase activity of three strains of *Lactobacillus acidophilus*”, *Journal of Dairy Science*, 82 (3): 472-480 (1999).

Çakır, İ, Karahan, A.G., Çakmakçı, M.L., “Probiyotikler ve etki mekanizmaları”, *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 6(12): 15-9 (2002).

Darilmaz, D., Aslım, B., Suludere, Z., Akca, G., "Influence of gastrointestinal system conditions on adhesion of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains to caco-2 cells", *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54 (5): 917-926 (2011a).

Darilmaz, D.O., Beyatli, Y. “Investigating Hydrophobicity and the Effect of Exopolysaccharide on Aggregation Properties of Dairy Propionibacteria Isolated from Turkish Homemade Cheeses”, *Journal of Food Protection*, 75 (2): 359-365 (2012).

Darilmaz, D.O., Beyatli, Y., “Acid-bile, antibiotic resistance and inhibitory properties of propionibacteria isolated from Turkish traditional home-made cheeses”, *Anaerobe*, 18: 122-127 (2011b).

Davidson, P.M., Hoover D.G., “Antimicrobial components from Lactic acid bacteria in Lactic acid bacteria ”, **Marcel Dekker**, New york, 120: 127-159 (1993).

De Man, J. C., Rogosa, M., Sharpe, M. E., “A medium for the cultivation of lactobacilli”, **Bacteriology**, 23 (1): 130-135 (1960).

Demirci, M., Gündüz, H., “Süt Teknolojisi El Kitabı”, **Hasad Yayıncılık**, Ankara, 1-184 (1994).

Desai, K.M., Akolkar, S.K., Badhe, Y.P., Tambe, S.S., Lele, S.S., “Optimization of fermentation media for exopolysaccharide production from *Lactobacillus plantarum* using artificial intelligence-based techniques”, **Process Biochemistry**, 41: 1842-1848 (2006).

De Vuyst, L., Degeest, B., “Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria” , **FEMS Microbiology Reviews**, 23: 153-177 (1999).

Dixit, G., Samarth, D., Tale, V., Bhadekar, R., “Comparative studies on potential probiotic characteristics of *Lactobacillus acidophilus* strains”, **EurAsian Journal of BioSciences**, 7: 1-9 (2013).

Doron, S., Snyderman, D.R., Gorbach, S.L., “*Lactobacillus* GG: Bacteriology and Clinical Applications” **Gastroenterol Clinics of North America**, 34 (3): 483-498 (2005).

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Pebers, P.A., Smith, F., “Colorimetric method for determination of sugars and related substances” , **Anal Chem**, 28 (3): 350–356 (1956).

Dunne, C., Myrphy, L., Flynn, S., O’Mahony, L., O’Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G, Daly, C., Kiely, B., Quigley, E. M. M., O’sullivan, G. C., Shanahan, F. and Collins, J. K., “Probiotics: From myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials” , **Anton Leeuw Journal**, 76: 279-292 (1999).

Ekmekçi, H., Aslim, B., Darılmaz, D.O., “Some factors affecting the autoaggregation ability of vaginal *lactobacillus* isolated from turkish women”, **Archives Biological Sciences**, 61 (3): 407-412(2009).

Erdeve, O., Tiras, U., Dallar, Y., Savaş, S., “*Saccharomyces boulardii* and antibiotic-associated diarrhoea in children”, **Aliment Pharmacology and Therapeutics**, 21 (12): 1508-1509 (2005).

Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gil, A., “Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics”, **British Journal of Nutrition**, 109: 35–50(2013).

Fukuda, K., Shi, T., Nagami, K., Leo, F., Nakamura, T., Yasuda, K., Senda, A., Motoshima, H., Urashima, T., “Effects of carbohydrate source on physicochemical properties of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus fermentum* TDS030603 in a chemically defined medium”, *Carbohydrate Polymers*, 79 (4): 1040–1045 (2010).

Garcia, J., L., Uhia, I., Galan, B., “Catabolism and biotechnological applications of cholesterol degrading bacteria”, *Microbial Biotechnology*, 5 (6): 679–699 (2012).

Gilliland, S. E., “Enzymatic determination of residual hydrogen peroxide in milk”, *Dairy Science*, 52 (3): 321-324 (1969).

Gilliland, S.E., Nelson, C.R., Maxwell, C., “Assimilation of Cholesterol by *Lacobacillus acidophilus*”, *Applied and Environmental Microbiology*, 49 (2): 377-381 (1985).

Goldin, B.R., Gorbach, S.L., “Clinical indications for probiotics: an overview”, *Clinical Infectious diseases*, 46 (2): 96-100 (2008).

Goldman, A.S., “The immune system of human milk: antimicrobial, antiinflammatory and immunomodulating properties”, *Pediatr Infectious Disease*, 12 (8): 664-71 (1993).

Gonzalez, L., Sandoval, H., Sacristan, N., Castro, J.M., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E., “Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity”, *Food Control*, 18 (6): 716-722 (2007).

Gorbach, S.L., “Probiotics in the third millennium”, *Digest Liver Disease*, 34 (21): 2-7 (2002).

Gotcheva, V., Hristozova, E., Hristozova, T., Guo, M., Roshkova, Z., Angelov, A., “Assessment of potential probiotic properties of lactic acid bacteria and yeast strains”, *Food Biotechnology*, 16 (3): 211-225 (2002).

Grover, S., Rashmi, H.M., Srivastava, A.K., Batish, V.K., “Probiotics for human health–new innovations and emerging trends”, *Gut pathogens*, 4 (1): 1-14 (2012).
Guarner, F., Malagelada, J.R., “Gut flora in health and disease”, *Lancet*, 360: 512-19 (2003).

Gusils, C., Cuzzo, S., Sesma, F., Gonzalez, S., “Examination of adhesive determinants in three species of *Lactobacillus* isolated from chicken”, *Microbiology*, 48 (1): 34-42 (2002).

Gürsoy, O., Kınık, Ö., Gönen, İ., “Probiyotikler ve Gastrointestinal Sağlığa Etkileri”, *Türk Mikrobiyol Cem. Derg.*, 35 (2): 136-148 (2005).

Halkman, A.K., “Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları”, *Başak Matbaacılık Ltd Şti.*, 246: 243-244 (2005).

Halit, H., “Vajen kaynaklı *Lactobacillus* spp.’nin ekzopolisakkarit (EPS) üretimlerinin antibiyotik dirençliliğine ve epitel hücre yüzeylerine yapışmadaki etkisi”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara*, 43-55(2007).

Hassanzadazar, H., Ehsani, A., Mardani, K., Hesari, J., “Investigation of antibacterial, acid and bile tolerance properties of lactobacilli isolated from Koozeh cheese”, *Veterinary Research Forum*, 3 (3): 181-185 (2012).

Hekmat, S., Reid, G., “Sensory Properties of Probiotic Yogurt is Comparable to Standard Yogurt”, *Nutrition Research*, 26 (4): 163-166 (2006).

Hoyos, A.B., “Reduced incidence of necrotizing enterocolitis associated with enteral administration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* to neonates in an intensive care unit”, *Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 3 (4): 197-202 (1999).

Huang, Y., Adams, M. C., “In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy *Propionibacteria*”, *Food Microbiology*, 91 (3): 253-260 (2004).

Hwanhlem, N., Watthanasakphuban, N., Riebroy, S., Benjakul, S., Maneerat, S., “Probiotic lactic acid bacteria from Kung-Som: isolation, screening, inhibition of pathogenic bacteria”, *International Journal of Food Science Technology*, 45 (3): 594-601 (2010).

Hylander, M.A., Strobino, D.M., Dhanireddy, R., “Human milk feedings and infection Among Very Low Birth Weight Infants”, *Pediatrics*, 102 (3): 1-38 (1998).

Hylckama, Vlieg van, J.E., T., Hugenholtz, J., “Mining natural diversity of lactic acid bacteria for flavour and health benefits”, *International Dairy*, 17 (11): 1290-1297 (2007).

İnternet: Anonim, “1996 Publications”
<http://www.extension.iastate.edu/Publications/NCR332.pdf> (1996).

İnternet : Turantas, F., “2007 Laktik Asit Bakterileri Tarafından Hidrojen Peroksit Üretimi”,
<http://www.fulyaturantas.com/Bilimsel/H2O2.doc>(2007).

İşleroğlu, H., Yıldırım, Z., Yıldırım, M., “Yöresel peynirden antimikrobiyal aktiviteye sahip laktik asit bakterisinin izolasyonu ve tanısı”, *Gazi Osmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25 (1): 1–6 (2008).

Jara, S., Sánchez, M., Vera, R., Cofré, J., Castro, E., “The inhibitory activity of *Lactobacillus* spp. isolated from breast milk on gastrointestinal pathogenic bacteria of nosocomial origin”, *Clinical Microbiology*, 17: 474-477 (2011).

Jones, M.L., Chen, H., Ouyang, W., Metz, T., Prakash, S., “Microencapsulated genetically engineered *Lactobacillus plantarum* 80 (pCBH1) for bile acid deconjugation and its implication in lowering cholesterol”, *Biomedicine and Biotechnology*, 1: 61-69 (2004).

Juven, B.J., Meinersmann, R.J., Stern, N.J., “Antagonistic effects of Lactobacilli and Pediococci to control intestinal colonization by human enteropathogens in live poultry”, *Applied Bacteriology*, 70: 90-95 (1991).

Juven, B.J., Schved, F., Lindner, P., “Antagonistic compounds produced by a chicken intestinal strain of *Lactobacillus acidophilus*”, *Food Protection*, 55 (3): 150-157 (1992).

Kabore, D., Sawadogo-Lingani, H., Dicko, M., Diawara, B., Jakobsen, M., “Acid resistance, bile tolerance and antimicrobial properties of dominant lactic acid bacteria isolated from traditional “maari” baobab seeds fermented condiment”, *African Journal of Biotechnology*, 11(5): 1197-1206 (2012).

Karaca, H., “Metabolik Mühendisliğinde Laktik Asit Bakterileri”, *Akademik Gıda*, 8 (1): 32-38 (2010).

Kelleher, S.L., Lonnerdal, B., “Immunological activities associated with milk”, *Advances in Nutritional Research*, 10: 39-65 (2001).

Kılıç, S., “Süt Endustrisinde Laktik Asit Bakterileri”, *E. Ü. Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü*, 41 (2): 197-204 (2001).

Klaenhammer, T.R., “Bacteriocins of lactic acid bacteria”, *Biochimie*, 70 (3): 337-349 (1988).

Kleerebezem, M., Kranenburg, R., Tuinier, R., Boels, I., Zoon, P., Looijesteijn, E., Hugenholtz, J., “Exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*: from genetic engineering to improved rheological properties”, *Antonie van Leeuwenhoek*, 76 (4): 357-365 (1999).

Kleerebezem, M., Boels, I., Groot, M., Mierau, I., Sybesma, W., Hugenholtz, J., “Metabolic engineering of *Lactococcus lactis*: the impact of genomics and metabolic modelling”, *Journal of Biotechnology*, 98 (3): 199-213 (2002).

Kleerebezem, M., Hugenholtz, J., “Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria”, *Current Opinion in Biotechnology*, 14 (2): 232-237 (2003).

Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H., "Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yogurt", *International Dairy*, 13 (1): 3-13 (2003).

Lang, C., Böttner, M., Holz, C., Veen, M., Ryser, M., Reindl, A., Tanzer, J.M. "Specific lactobacillus/mutans streptococcus co-aggregation", *Journal of Dental Research*, 89 (2): 175-179 (2010).

Lankaputhra, W.E.V., Shah, N.P., "Adherence of probiotic bacteria to human colonic cells", *Bioscience and Microflora*, 17 (2): 105-113 (1998a).

Lankaputhra, W.E.V., Shah, N.P., "Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acids", *Mutation Research*, 397 (2): 169-182 (1998b).

Lee, Y.K., Nomoto, K., Salminen, S., Gorbach, S.L., "Handbook of Probiotics", *John Wiley and Sons*, Canada, 1-211 (1999).

Leroy, F., Vuyst, L., "Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation and industry", *Trends in Food Science and Technology*, 15 (2): 67-78 (2004).

Lim, H., Kim, S., Lee, W., "Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use", *Journal Vet Science*, 5 (4): 391-395 (2004).

Lin, W.H., Hwang, C.F., Lin, L.W., Tsen, H.Y., "Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products", *Food Microbiology*, 23 (1): 74-81 (2006).

Lye, H.S., Rusul, G., Liong, M.T., "Mechanisms of cholesterol removal by *Lactobacillus* under conditions that mimic the human gastrointestinal tract", *International Dairy*, 20 (3): 169-175. (2010).

Madureira, A.R., Amorim, M., Gomes, A.M., Pintado, M.E., Malcata, F. X. "Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions", *Food Research International*, 44(1): 465-470 (2011).

Makino, S., Ikegami, S., Kano, H., Sashihara, T., Sugano, H., Horiuchi, H., Saito, T., Oda, M., "Immunomodulatory effects of polysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1", *Dairy Science*, 89 (8): 2873-2881 (2006).

Messaoudi, M., Lalonde, R., Violle, N., Javelot, H., Desor, D., Nejd, A., Cazaubiel, J.M., "Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects", *British Journal of Nutrition*, 105 (5): 755-764 (2011).

Meier, R., Steuerwald, M., "Place of probiotics", *Current Opinion in Critical Care*, 11 (4): 318-325 (2005).

Millette, M., Luquet, F.M., Lacroix, M., “In vitro growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*-fermented milk”, *Letters in Applied Microbiology*, 44 (3): 314-319 (2006).

Millsap, K., Reid, G., Van, H., Mei, H., “Adhesion of *Lactobacillus* species in urine and phosphate buffer to silicone rubber and glass under flow”, *Biomaterials*, 18 (1): 87–91 (1996).

Mitsuoka, T., “Bifidobacteria and their Role in Human Health”, *Industrial Microbiology*, 6 (4): 263-268 (1990).

Mohammadi, F., Mohammadi, M., Bagheri, A., Roozbahani, H., “Probiotics in human health”, *European Journal of Experimental Biology*, 3(2): 116-120 (2013).

Muriana, P.M., Klaenhammer, T.R., “Purification and partial characterization of lactacin f, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088”, *Appl. Environ Microbiol.*, 57 (1): 114–121 (1991).

Nakajima, H., Suzuki, Y., Hirota, T., “Cholesterol lowering activity of ropy fermented milk”, *Food Science*, 57 (6): 1327-1329 (1992).

Narayanan, N., Roychoudhur, Y., P.K., Srivastava, A., “L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization”, *Electronic Journal of Biotechnology*, 7 (2): 167-179 (2004).

Nawaz, M., Wang, J., Zhou, A., Ma, C., Wu, X., Xu, J., “Screening and characterization of new potentially probiotic lactobacilli from breast-fed healthy babies in Pakistan”, *African Journal of Microbiology*, 5 (12): 1428-1436 (2011).

Neish, A., “Microbes in gastrointestinal health and disease”, *Gastroenterology*, 136 (1): 65-80 (2009).

Nickerson, J.T., Sinskey, A.J., “Microbiology of Food and Food Processing”, *American Elsevier Publishing Company*, New York 234-306 (1972).

Nguyen, T.D.T., Kang, J.H., Lee, M.S., “Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects”, *International Journal of Food Microbiology*, 113: 358–361 (2007).

Nopchinda, S., Varavithya, W., Phuapradit, P., “Effect of Bifidobacterium Bb12 with or without *Streptococcus thermophilus* supplemented formula on nutritional status”, *Chotmaihet Thangphaet Tip Derneği Dergisi*, 85 (4): 1225-31 (2002).

Okereke, A., Montville, T.J., “Bacteriocin-mediated inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria at refrigeration and abuse temperatures”, *Applied and Environmental Microbiology*, 57(12): 3423-3428(1991).

Olivares, M., "Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk." *Journal of Applied Microbiology*, 101 (1): 72-79 (2006).

Oshiro, M., Shinto, H., Tashiro, Y., Miwa, N., Sekiguchi, T., Okamoto, M., Ishizaki, A., Sonomoto, K., "Kinetic modeling and sensitivity analysis of xylose metabolism in *Lactococcus lactis* IO-1", *Bioscience and Bioengineering*, 108 (5): 376–384 (2009).

Özen, H., "Bebek beslenmesinde probiyotikler", *40. Türk Pediatri Kongresi*, İstanbul, 24-40 (2004).

Pant, A.R, Graham, S.M., Allen, S.J., "Lactobacillus GG and acute diarrhea in young children in the tropics", *Tropical Pediatrics*, 42 (3): 162-5 (1996).

Parvez, S., Malik, K.A., Ah Kang, S., Kim, H.Y., "Probiotics and their fermented food products are beneficial for health", *Journal of Applied Microbiology*, 100: 1171-1185 (2006).

Pelletier, C., Bouley, C., Cayuela, C., Bouttier, S., Bourlioux, P., Bellon-Fontaine, M.N., "Cell surface characteristics of *L. casei* ss *casei*, *L. paracasei* ss *paracasei* and *L. rhamnosus* strains", *Appl Environ Microbiol*, 63 : 1725–1731 (1997).

Pendharkar, S., Magopane, T., Larsson, P., Bruyn, G., Gray, G., Hammarström, L., Marcotte, H., "Identification and characterisation of vaginal lactobacilli from South African women", *BMC Infectious Diseases*, 13(43): 1471-2334 (2013).

Prabhu, P., Srinivas, R., Srinivasa, T.S., "Probiotics for Prevention", *International Journal of Contemporary Dentistry*, 3 (1): 68-72 (2012).

Pridmore, R.D., Pittet, A.c., Praplan, F., Cavadini, C., "Hydrogen peroxide Production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti Salmonella activity", *FEMS Microbiology Letters*, 283 (2): 210-215 (2008).

Raus-Madiedo, P., Gueimonde, M., Margolles, A., De Los Reyes-Gavilan, C.G., Salminen, S., "Effect of exopolysaccharide isolated from "viili" on the adhesion of probiotics and pathogens to intestinal mucus", *Journal Dairy Scienc*, 89: 2355-2358 (2006).

Reid, G., "Probiotics for Urogenital Health", *Nutrition in Clinical Care*, 5 (1): 3-8 (2002).

Reid, G., Burton, J., "Use of *Lactobacillus* to Prevent Infection by Pathogenic Bacteria", *Microbes and Infection*, 4 (3): 319-324 (2002).

Reinheimer, J.A., Demkow, M.R., Condioti, M.C., "Inhibition of Coliform bacteria by lactic cultures", *Australian Journal of Dairy Technology*, 45 (1): 5-9 (1990).

Resta, S.C., “Effects of probiotics and commensals on intestinal epithelial physiology: implications for nutrient handling”, *Physiology*, 587 (17): 4169-4174 (2009).

Rinne, M., Kalliomaki, M., Salminen, S., Isolauri, E., “Probiotic Intervention in the First Months of Life: Short-Term Effects on Gastrointestinal Symptoms and Long-Term Effects on Gut Microbiota”, *Pediatr Gastroenterol*, 43 (2): 200-205 (2006).

Rudel, L.L., M.D., Morris, “Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde”, *The Journal of Lipid Research*, 14: 364-366 (1973).

Sabir, F., Beyatli, Y., Cokmus, C., Darilmaz, D., "Assessment of potential probiotic properties of *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. and *Pediococcus* spp. strains isolated from kefir", *Journal of Food Science*, 75 (9): 568-573 (2010).

Saxelin, M., “Lactobacillus GG-a Human Probiotic Strain with Thorough Clinical Documentation”, *Food Reviews International*, 13 (2): 293–313 (1997).

Salminen, S., Nybom, S., Meriluoto, J., Collado, M.C., Vesterlund, S., El-Nezami, H., “Interaction of probiotics and pathogens—benefits to human health”, *Current opinion in biotechnology*, 21 (2): 157-167 (2010).

Sağdıç, O., Küçüköner, E., Özçelik, S., “Probiyotik ve Prebiyotiklerin Fonksiyonel Özellikleri”, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35 (3-4): 221-228 (2004).

Schachtsiek, M., Hammes, W.P., Hertel, C., “Characterization of *Lactobacillus cornyformis* DSM 20001T surface protein Cpf mediating coaggregation with and aggregation among pathogens”, *Institute of Food Technology*, 70 (12): 7078–7085 (2004).

Scholtens, PAMJ., Alles, M.S., Bindels, J.G., “Bifidogenic effects of soild weaning foods with added prebiotic oligosaccharides: A randomised controlled clinical trial”, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 42 (5): 553-9 (2006).

Seçkin, A.K., Baladura, E., “Süt ve Süt Ürünlerinin Fonksiyonel Özellikleri”, *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 7 (1): 27–38 (2011).

Shah, N. P., “Functional foods from probiotics and prebiotics”, *Food Technology*, 55 (11): 46-53 (2001).

Sieladie, D., Zambou, N., Kaktcham, P., Cresci, A., Fonteh, F., “PROBIOTIC Properties of Lactobacilli Strains Isolated From Raw Cow Milk In The Western Highlands Of Cameroon”, *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 9: 12-28 (2011).

- Silva, M., Jacobus, N.V., Deneke, C., Gorbach, S.L., “Antimicrobial Substance from a Human *Lactobacillus* strain”, *Antimicrob Agents Chemother*, 31 (8): 1231-1233 (1987).
- Simadibrata, M., Ndraha, S., Tedjasaputra, R., Syam, A.F., Santi, A.F.A., Rani, A. “Revealing the effect of probiotic combination: *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus acidophilus* (Lacidofil®) on acute diarrhea in adult patients”, *Journal of Clinical Medicine and Research*, 5(2): 23-28 (2013).
- Spear, H.J., “Breastfeeding and support”, *AWHONN Lifelines*, 9 (2): 181-3 (2005).
- Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Sorrentino, E., Grazia, L., Pacifino, F. Coppola, R., “Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolates from Parmigiano Reggiano cheese”, *FEMS Microbiol. Lett.*, 244: 129-137 (2005).
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., Kailasapathy, K., “Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-strach and evaluation of survival in simulated gasrtointestinal conditions and in yoghurt”, *International Journal of Food Microbiology*, 62 (1-2): 47-55 (2000).
- Szajewska, H., Kotowska, M., Murkowicz, J.Z., Armanska, M., Mikolajczyk, W., “Efficacy of *Lactobacillus* GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants”, *Journal of Pediatrics*, 138 (3): 361-5 (2001).
- Şengül, N. Aslim, B., Uçar, G., Yücel, N., Bozkurt, H., Sakaoğulları, Z., Atalay, F., “Effects of exopolysaccharide-producing probiotic strains on experimental colitis in rats”, *Dis Colon Rect*, 49: 250-258 (2006).
- Tanaka, H., Doesburg, K., Iwasaki, T., Mierau, I., “Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity”, *Journal of Dairy Science*, 82 (12): 2530-2535 (1999).
- Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., Swings, J., “ Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products”, *International Journal of Food Microbiology*, 81: 1-10 (2003).
- Tezcan, F.İ., “İntestinal immun sistem”, *Türkiye Klinikleri Journal. Pediatr. Scince.*, 3(6): 65-7 (2007).
- Tıraş, Ü., Yalaki, Z., Öztürk, A., Dallar, Y., “Tekrarlayan Nekrotizan Enterokolitte Oral Saccharomyces”, *Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği*, 6: 121-124 (2010).
- Tok, E.,Aslim, B., “Cholesterol removal by some lactic acid bacteria that can be used as probiotic”, *Microbiology and Immunology*, 54(5): 257-264 (2010).

Torino, M., Taranto, M., Sesma, F., Valdez, G., “Heterofermentative pattern and exopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* 15807 in response to environmental pH”, *Journal Appl Microbiol*, 91 (5): 846-852 (2001).

Tuo, Y., Zhang, W., Zhang, L., Ai, L., Zhang, Y., Han, X., Yi, H., “Study of probiotic potential of four wild *Lactobacillus rhamnosus* strains”, *Clinical Microbiology*, 21: 22-27 (2013).

Usman, H.A., “Bile tolerance, taurocholate deconjugation, and binding of cholesterol by *Lactobacillusgasseri* strains”, *Journal Dairy Science*, 82 (2): 243–248 (1999).

Vikova, E., Rada, V., Ova, S., Killer, J., “Auto-Aggregation and Co-Aggregation Ability in Bifedebacteria and Clostridia”, *Folia Microbial*, 53(3): 263-269 (2008).

Wang, L.M., Zhao, B., Liu, B., Yang, C.Y., Yu, B., Li, Q.G., Ma, C.Q., Xu, P., Ma, Y.H., “Efficient production of L-lactic acid from cassava powder by *Lactobacillus rhamnosus*”, *Bioresour Technol*, 101:7895–7901 (2010).

Warminska-Radyo, I., Laniewska-Moroz, L., Babuchowski, A., “ Possibilities for stimulation of *Bifidobacterium* growth by propionibacteria”, *Lait*, 82 (1): 113-121 (2002).

Welman, A. D., Maddox, S., “Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges”, *Trends in Biotechnology*, 21 (6): 269-274 (2003).

Wilkins, K.M., Board, R.G., “Natural antimicrobial systems. In: G.W. Gould (editor), Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures”, *Elsevier Applied Science*, 1 (85): 166-293 (1989).

Xiao, J.Z., Takahashi, S., Odamaki, T., Yaeshima, T., Iwatsuki, K. “Antibiotic susceptibility of bifidobacterial strains distributed in the Japanese marke”, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 74 (2): 336-342 (2010).

Yenieli, N., Aslim, B., Beyatli, Y., Yuksekdag, Z., “Determination of Lactic Acid and Exoplysaccharides Production in Low-cost Raw Materials by some *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* Strains”, *Academic Journals*, 7 (24): 4614-4619 (2007).

Yılsay, T.Ö., Kurdal, E., “Probiyotik süt ürünlerinin beslenme ve sağlık üzerinde etkisi”, *Süt ve Süt Ürünleri Senpozyumu (Süt Mikrobiyolojisi ve katkı maddeler)*, Tekirdağ, 279-286 (2000).

Young, R.J., Huffman, S., “ Probiotic use in children”, *Journal Pediatr Health Care*, 17 (6): 277-283 (2003).

Yuksekdag, Z., Aslim, B., "Influence of different carbon sources on exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (B3,

G12) and *Streptococcus thermophilus* (W22)", *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51 (3): 581-585 (2008).

Yuksekdag, Z.N., Aslim, B., "Assessment of potential probiotic and starter properties of *Pediococcus* spp. isolated from Turkish-Typefermented sausages (Sucuk)", *Journal Microbiology Biotechnology*, 20 (1): 161-168 (2010).

Yücesan, S., "Probiyotikler ve sağlık üzerine etkileri", *Türk Diyetisyenler Derneği Bülteni*, 2 (3): 1-13 (2002).

Yüksekdağ, Z.N., Beyatlı, Y., Aslım, B., "Metabolic activities of *Lactobacillus* spp. strains isolated from kefir", *Nahrung/FOOD*, 48 (3): 218–220 (2004a).

Yüksekdağ, Z.N., Beyatlı, Y., Aslım, B., "Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic", *Lebensmittel Wissenschaft andTechnologie*, 37 (6): 663–667(2004b).

Zhou, J.S., Pillidge, C.J., Gopal, P.K., Gill, H.S., "Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains", *Journal Food Microbiol*, 98: 211-217 (2005).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : MEHRNIA, LEILA
Uyruđu :.IRANLI
Doğum tarihi ve yeri : 22.09.1979 TABRİZ
Medeni hali : Bekar
e-mail : leyla_48@yahoo.com.

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	BOROOJERD AZAD ESLAMİ	2002
Lise	HAJER	1998

Yabancı Dil

İngilizce