



**FARKLI KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK
ASİT BAKTERİLERİNİN (LAB) PROBİYOTİK
POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ**

Yasemin KAYA

**Yüksek Lisans Tezi
Gıda Mühendisliği
Anabilim Dalı
Doç. Dr. Enes DERTLİ
2020
(Her Hakkı Saklıdır)**

T.C
BAYBURT ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**FARKLI KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN (LAB)
PROBİYOTİK POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ**

(Determination Of Probiotic Potential Of Lactic Acid Bacteria (LAB) İsolated From Different Origins)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yasemin KAYA

Birinci Danışman: Doç. Dr. Enes DERTLİ
İkinci Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Tayyibe ERTEN

Bayburt
Şubat, 2020

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Doç. Dr. Enes DERTLİ ve Dr. Öğr. Üyesi Tayyibe ERTEN danışmanlığında, 182003006 numaralı Yasemin KAYA tarafından hazırlanan “Farklı Kaynaklardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) Probiyotik Potansiyelinin Belirlenmesi” adlı bu çalışma 28/02/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gıda Mühendisliği (Atatürk Üniv. Ortak) Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Mustafa ŞENGÜL

İmza:

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Enes DERTLİ

İmza:

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Tayyibe ERTEN

İmza:

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÇAKIR

İmza:

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Emin MERCAN

İmza:

Bu tezin Bayburt Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

02 / 03 / 2022

Doç. Dr. Fatih GÜRBÜZ
Enstitü Müdür Vekili

ETİK BİLDİRİMİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum ‘‘Farklı Kaynaklardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) Probiyotik Potansiyelinin Belirlenmesi’’ başlıklı çalışmanın tarafımdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını ve yararlandığım eserleri kaynakçada gösterdiğimi beyan ederim.

...../...../.....

Yasemin KAYA



TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince karşılaştığım sorunları çözmemde büyük bir özveriyle yardımcı olan, lisans eğitimimden itibaren bilimsel çalışma ve iş disiplini her zaman örnek aldığım, akademik gelişimimde büyük emeği olan, karşılaştığım sorunlarla farklı bir bakış açısı ile kolaylıklar getiren, çalışmamda elde ettiğim sonuçlarının yorumlanmasında yardımcı olan, bir insanın en büyük sermayesi olan zamanını benim için harcayan, bana gösterdiği sabır ve anlayışıyla güzel bir çalışma ortamı sağlayan, laboratuvarında her türlü imkânları sağlayan, değerli danışmanım ve saygıdeğer hocam Sayın Doç. Dr. Enes DERTLİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimi büyük bir titizlikle inceleyen, yaptıkları düzeltmeler ve yapıcı eleştirileri ile tezimin şekillenmesine katkı sağlayan, İkinci Danışmanım Sayın Dr. Öğretim Üyesi Tayyibe ERTEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca her zaman yardımcı olan, sahip olduğu değerli bilgi ve birikimleri paylaşmaktan çekinmeyen, sadece laboratuvarında değil karşılaştığım diğer sorunlarda da fikrine başvurduğum, lisans eğitimimden beri aynı ortamda çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum, hem akademik anlamda hemde tecrübe ve deneyimleriyle desteğini gördüğüm değerli ablam Sayın Öğretim Görevlisi Hümeysra İSPİRLİ'ye göstermiş olduğu sabırdan dolayı teşekkürlerimi sunarım.

HPLC analizlerimde yardımcı olan Öğretim Görevlisi Sayın Mustafa Onur YÜZER'e, lisans eğitimimden beri yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Emin MERCAN'a ve tez sürecinde yardımcı olan Araştırma Görevlisi Sayın Emin USLU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Lisans eğitiminden itibaren yeri bende farklı olan ve her zaman da öyle olacağına inandığım, lisans ve yüksek lisans olmak üzere toplam 6 yılda geçirdiğimiz her vakitte doyasıya eğlendiğim, artık arkadaşlıktan öte kardeşim dediğim, Gıda Yüksek Mühendisi Adayı Melike VURMAZ'a bu süreçte her zaman yanımda olduğu için teşekkürlerimi sunarım.

Bu günlere gelebilmem için her türlü fedakârlığı yapan maddi-manevi desteklerini her zaman gördüğüm, , hayata dair cesur ve kararlı olmamı sağlayan sevgili babam Murat KAYA, annem Songül KAYA, kardeşim Turan KAYA, babaannem Güllü KAYA, halam Fırgat MALLI ve eniştem Faik MALLI'ya tüm içtenliğimle teşekkürlerimi sunarım.

Yasemin KAYA

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN (LAB) PROBİYOTİK POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ

Yasemin KAYA

Şubat 2020, 122 sayfa

Probiyotikler, gastrointestinal sistem şartlarında canlılığı kaybetmeden insan bağırsak mukozasına kolonize olan ve intestinal sistemde çeşitli fonksiyonlar icra ederek canlıların sağlığını olumlu yönde etkileyen mikroorganizmalardır. Şimdiye kadar farklı kaynaklardan probiyotik suşlar elde edilmiş ve bir kısmı çeşitli pazar paylarına ulaşmıştır. Yeni potansiyel probiyotik suşların izolasyonu da giderek önemi artan bir konu haline gelmiştir. Bu kapsamda bu tez çalışmasında ekşi hamur ve yeni doğmuş bebek dışkısından izole edilip tanımlanmış olan Laktik Asit Bakterisi (LAB) türlerinin probiyotik potansiyellerinin ortaya çıkartılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda test edilen suşlarda öncelikle EPS üretiminden sorumlu genlerin tespiti için PCR işlemi uygulanmıştır. Daha sonra üretilen EPS'in üretim seviyesi DNS metodu ile belirlenirken, EPS'lerin monosakkarit kompozisyonu ise HPLC analizi ile ortaya konmuş ve bütün suşların glukoz monomerinden oluştuğu tespit edilmiştir. Bu suşlarda antibiyotik dirençliliği test edilmiş, kanamycine karşı tüm suşlar direnç gösterirken, streptomycine karşı ise *L.rhamnosus* C-9A ve *P.pentosaceus* WPS-8 suşları dışındaki tüm suşlar direnç göstermiştir. Genellikle suşların çoğu, analiz edilen patojenlere karşı etki gösterirken, *L.rhamnosus* C-9A ve *L.paracasei* WPS-11 suşları ise *Salmonella typhimurium*'a karşı etki göstermemiştir. Ayrıca antifungal etki için 6 farklı küfe karşı etki araştırılmış ve test edilen türlerin önemli oranda antifungal aktivitesi olduğu ortaya konmuştur. Türler arasında belirgin farklılıklar olmakla birlikte n-hexadecene ile yapılan hidrofobite tespitinde suşlar %3-81.2 oranında tutunma gösterdiği, en yüksek hidrofobikliği ise *P.pentosaceus* WPS-8 suşunun gösterdiği tespit edilmiştir. Ardından suşların insan HT-29 hücre hattına tutunma yetenekleri incelenmiştir. Tutunma oranlarının %0.29-9.54 arasında değiştiği ve *L.paracasei* C-7B suşunun en yüksek tutunum kapasitesine sahip olduğu görülmüştür. Genel olarak 24 saatlik inkübasyondan sonra tüm suşların iyi oranda safrayı tolere ettikleri tespit edilirken, pH 4'de ekşi hamurdan izole edilen suşların gelişimlerinde önemli oranda düşüş meydana geldiği tespit edilmiştir. Yine aynı şekilde simüle edilmiş gastrointestinal şartlarda suşların canlılıkları %39-97 arasında olduğu gözlemlenmiştir. Son olarak suşların GABA üretimi HPLC işlemi ile incelenmiştir. Sonuç olarak fermete ürünlerden ve bebek dışkısından izole edilen LAB türlerinden bazılarının potansiyel probiyotik olabilecekleri ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Probiyotik, ekşi hamur, HT-29 hücre hattı, GABA.

ABSTRACT

MASTER THESIS

DETERMINATION OF PROBIOTIC POTENTIAL OF LACTIC ACID BACTERIA (LAB) ISOLATED FROM DIFFERENT ORIGINS

Yasemin KAYA

February 2020, 122 pages

Probiotics are beneficial microorganisms that show survival under gastrointestinal conditions, adhesion to the intestinal surface and different functions which result in several health benefits to the host. With this regards, this study aimed to isolate LAB from sourdough and human feces and test their potential probiotic functions. At first, the genes responsible for the EPS production were detected by PCR analysis. Then the level of EPS production was determined by DNS analysis and the monomer composition of the EPS structure was determined by HPLC analysis and in all EPSs from distinct strains glucose was detected. In antibiotic sensitivity tests, while all isolates were resistant to kanamycin, all isolates were resistant to streptomycin, except *L. rhamnosus* C-9A and *P. pentosaceus* WPS-8 strains. In general, antimicrobial activity was observed against tested pathogens except *L.rhamnosus* C-9A and *L.paracasei* WPS-11 which did not reveal any antimicrobial activity against *Salmonella typhimurium*. The antifungal activity of the isolates was determined against 6 fungi and all strains revealed different level of antifungal activity. The cell surface hydrophobicity was determined with n-hexadecene and strains revealed % 3-81.2 level of hydrophobicity and *P.pentosaceus* WPS-8 showed the highest hydrophobicity. Importantly, the adhesion to HT29 cells was determined and the adhesion levels were determined between %0.29-9.54 and *L.paracasei* C-7B showed the highest adhesion. In general all isolates tolerated the bile salt after 24 h and the sourdough isolates showed lower level of survival at pH 4. Similarly, the survival under simulated gastrointestinal conditions of the isolates was determined to be between %39-97. Production of GABA among the LAB isolates was also determined as an important compound for neural system. In conclusion, tested isolates from sourdough and human feces could be potential probiotic strains.

Keywords: Probiotic, sourdough, HT29 cell line, GABA.

İÇİNDEKİLER

ETİK BİLDİRİMİ	i
TEŞEKKÜR	ii
ÖZ	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	xi
BİRİNCİ BÖLÜM	1
Giriş	1
İKİNCİ BÖLÜM	4
Kaynak Özetleri	4
Probiyotiğin Tanımı ve Tarihçesi	4
Bağırsak Sisteminin Mikroflorası	5
Probiyotik Mikroorganizma ile Konak Hücre Arasındaki Etkileşimi	9
Probiyotiklerin Güvenlik Kriterleri	11
Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar.....	12
Probiyotik laktobasiller.....	13
Probiyotik Mikroorganizmaların Seçim Kriterleri	15
Gastrointestinal sistemde safra tuzuna karşı direnç.....	16
Gastrik asit toleransı özelliği.....	18
Antimikrobiyal aktivite.....	19
Hemolitik aktivite.....	20
Antibiyotik direnci.....	20
Antifungal aktivite.....	22
Tutunma özelliği.....	23
Ekzopolisakkarit (EPS) Üretim Özelliği.....	25
Probiyotiklerin Fonksiyonel Yönleri	27
Probiyotiklerin İnsan Sağlığı Üzerindeki Rolü.....	28
Laktoz intoleransının hafifletilmesi.....	28
İmmün sistemin kuvvetlendirilmesi.....	29

Diyare oluşumunun azaltılması.	29
Serum kolesterol seviyesinin düşürülmesi.....	30
Antikanserojen etki.	31
Gamma-Aminobütirik Asit (GABA) Üretimi.....	31
Tezin Amacı.....	33
ÜÇÜNCÜ BÖLÜM.....	34
Materyal ve Yöntem	34
Materyal	34
Çalışmada kullanılan suşlar.	34
Kültür ortamları.	34
Bakterilerin muhafazası.	34
Tampon ve çözeltiler.	35
Kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları.....	35
Kullanılan primerler.....	35
Kullanılan çözelti, besiyerleri ve malzemelerin sterilizasyonu.	35
Yöntem.....	36
EPS üretiminin yapısal karakterizasyonu.	36
Bakteriyel suşların modifiye sükrözlu BHI ortamında EPS izolasyonu ve saflaştırılması..	36
DNS yöntemi ile EPS üretim miktarının belirlenmesi.....	36
Ekzopolisakkaritlerin monosakkarit kompozisyonunun belirlenmesi.....	37
Suşların <i>in vitro</i> şartlar altında bazı probiyotik özelliklerinin tespiti.	37
Antibiyotik profili tespiti.	37
Antimikrobiyal etki spektrumunun belirlenmesi.	37
Antifungal aktivitelerinin belirlenmesi.....	38
Hidrofobisite (tutunma) niteliklerinin tespiti.....	38
Düşük pH ve safra tuzlarına karşı direncin belirlenmesi.....	39
Virülans faktörünün belirlenmesi.	39
Hemolitik aktivitenin tespiti.	39
Suşların <i>in vitro</i> şartlar altında gastrointestinal sistemde canlılığını koruyarak geçişinin belirlenmesi.	39
LAB suşlarının HT-29 insan epitelium hücrelerine tutunma analizi.....	40
Moleküler biyoloji işlemleri.	41
Genomik DNA izolasyonu.....	41
Homopolimerik ve heteropolimerik EPS üretiminden sorumlu genlerin tespiti.	41
PCR ile eps genlerinin amplifikasyonu.	41

PCR ürünlerinin jel elektroforezinde kontrolü.	42
Filogenetik analiz.....	43
γ - Aminobutirik asit (GABA) üretimi.	43
Glutamik asit dekarboksilaz (GAD) gen varlığının LAB suşlarında taranması.	43
GABA üreten LAB suşlarının tespiti.....	43
GABA üretim seviyelerinin belirlenmesi.	44
Amino asidin türevlendirilmesi.	44
HPLC analizi.....	44
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM.....	46
Araştırma Bulguları ve Tartışma.....	46
Filogenetik İlişki.....	46
Homopolimerik ve Heteropolimerik <i>eps</i> Gen Kümelerinin Tespiti.....	48
Ekzopolisakkarit (EPS) Üretiminin Yapısal Karakterizasyonu.....	52
DNS Metodu ile Belirlenen EPS Üretim Miktarı.....	57
Antibiyotik Hassasiyetinin Belirlenmesi.....	60
Antimikrobiyal Etkinin Belirlenmesi.....	64
Antifungal Aktivitenin Belirlenmesi.....	65
Hücre Yüzeyi Hidrofobikliği Testi.....	67
LAB Suşlarının HT-29 İnsan Epitelyum Hücrelerine Tutunumu.....	73
Düşük pH ve Safra Tuzu Toleransının Belirlenmesi.....	76
Hemolitik Aktivite.....	85
<i>In vitro</i> Şartlarda Gastrointestinal Sistemde Hayatta Kalma Testi.....	85
GAD Geni Varlığının LAB Suşlarında Taranması.....	88
GABA Üreten LAB Suşlarının Tespiti.....	89
GABA Üretim Seviyelerinin Belirlenmesi.....	90
BEŞİNCİ BÖLÜM.....	94
Sonuç ve Öneriler.....	94
Kaynakça.....	99
EKLER.....	118
ÖZGEÇMİŞ.....	122

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. <i>Sindirim Sisteminde Sıklıkla Karşılaşılan Mikroorganizmalar</i>	7
Tablo 2. <i>Probiyotikli Ürünlerde Yaygın Olarak Kullanılan Probiyotik Mikroorganizmalar</i> ..	13
Tablo 3. <i>Probiyotik Mikroorganizmaların Arzu Edilen Özellikleri</i>	16
Tablo 4. <i>Probiyotik Mikroorganizmaların İnsan Vücudunda ki Etkileri</i>	27
Tablo 5. <i>Tez Kapsamından Kullanılan Bakteriyel Suşlar</i>	34
Tablo 6. <i>Kullanılan Antibiyotikler ve Konsantrasyonları</i>	35
Tablo 7. <i>EPS Genlerinin Tespiti Amacıyla Kullanılan Primerler</i>	35
Tablo 8. <i>Çalışmada Kullanılan İndikatör Mikroorganizmalar</i>	38
Tablo 9. <i>EPS genlerinin Amplifikasyonu için Oluşturulan PCR Karışımı</i>	42
Tablo 10. <i>EPS Genlerinin Amplifikasyonu için Oluşturulan PCR Şartları</i>	42
Tablo 11. <i>LAB Suşlarının Homopolimerik EPS (LevV) ve Heteropolimerik EPS (epsA, epsEFG, epsB, epsE) Genlerinin Taranması</i>	50
Tablo 12. <i>MSBHI Ortamında Geliştirilen LAB Suşlarının EPS Üretim Seviyeleri</i>	58
Tablo 13. <i>LAB Suşlarının Antibiyotik Profilleri</i>	61
Tablo 14. <i>Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları</i>	64
Tablo 15. <i>LAB Türlerinin Antifungal Aktivite Sonuçları</i>	66
Tablo 16. <i>LAB Suşlarının n-hexadecane Karşı % Tutunmaları</i>	69
Tablo 17. <i>LAB Suşlarının İnsan Bağırsak Epitel HT- 29 Hücrelerine Tutunma Yeteneği</i>	73
Tablo 18. <i>LAB Suşlarının pH 4 ve %0.3 Safra Tuzundaki Tolerans Sonuçları</i>	77
Tablo 19. <i>LAB Suşlarının Sindirim Sistemi Modellemesi Dayanım Sonuçları</i>	86

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. İnsan gastrointestinal sistem mikroflorasının dağılımı.....	6
Şekil 2. Jejunum-ileum bölgesinde bulunan mikroorganizmalar	8
Şekil 3. Probiyotik mikroorganizmaların etki mekanizması	10
Şekil 4. Laktobasiller tarafından oluşturulan probiyotik etkinin mekaniksel görünümü.....	14
Şekil 5. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritlerin sağlığı teşvik etmeleri ile ilgili olası şematik gösterimi	25
Şekil 6. Probiyotiklerin fonksiyonelliğini etkileyen teknolojik faktörler	28
Şekil 7. GABA oluşumunun şematik gösterimi	32
Şekil 8. DNS metodunda kullanılan glukoz eğrisi.....	37
Şekil 9. Hyperladder I (Bioline, UK) fragment boyutları ve miktarları.	43
Şekil 10. GABA standardının kalibrasyon eğrisi.....	45
Şekil 11. Ekşi hamur ve yenidoğan dışkısı kaynaklı lab suşlarının 16s rRNA dizi analizine dayanan filogenetik ilişkisi.....	47
Şekil 12. Test edilen suşlarda <i>epsEFG</i> geninin taranması sonucu oluşan PCR görüntüsü.....	49
Şekil 13. <i>Lb. plantarum</i> WPS-12 tarafından üretilen EPS' in HPLC kromatogramı.	53
Şekil 14. <i>Lb. paracasei</i> WPS-11 tarafından üretilen EPS'in HPLC kromatogramı.....	53
Şekil 15. <i>P. pentasaceus</i> WPS-8 tarafından üretilen EPS'in HPLC kromatogramı.....	53
Şekil 16. <i>Lc. garvieae</i> WPS-3 tarafından üretilen EPS' in HPLC kromatogramı.....	54
Şekil 17. <i>Lb. graminis</i> WPS-1 tarafından üretilen EPS' in HPLC kromatogramı.	54
Şekil 18. <i>Lb. fermentum</i> C-9C tarafından üretilen EPS' in HPLC kromatogramı.	54
Şekil 19. <i>Lb. rhamnosus</i> C-9A tarafından üretilen EPS' in HPLC kromatogramı.....	55
Şekil 20. <i>Lb. paracasei</i> C-7B tarafından üretilen EPS' in HPLC kromatogramı.....	55
Şekil 21. <i>Lb. plantarum</i> C-6A tarafından üretilen EPS' in HPLC kromatogramı.....	55
Şekil 22. LAB suşları tarafından üretilen EPS'in üretim miktarlarının karşılaştırılması.	58
Şekil 23. <i>Lb. paracasei</i> C-7B ve <i>Lb. plantarum</i> WPS-12 suşlarının disk difüzyon yöntemi ile belirlenen antibiyotik hassasiyeti.	60
Şekil 24. Suşların antibiyotik disklerine karşı gösterdiği dirençlilik oranları.....	61
Şekil 25. <i>A. niger</i> 'in <i>Lb. plantatum</i> C-6A suşuna karşı antifungal etkisi.	66
Şekil 26. Farklı kaynaklardan izole edilen suşların izolat kaynağı ve suşlara göre %tutunma dağılımları	70
Şekil 27. LAB suşlarının HT-29 hücre hattına tutunum sonuçları.	74

Şekil 28. pH 4’de suşların farklı sürelerde, OD ₆₀₀ nm dalga boyunda okunan absorbands değerleri.....	78
Şekil 29. LAB suşlarının pH 4’de 24 saatlik inkübasyon sonucunda elde edilen %canlılık sonuçları	79
Şekil 30. %0.3 Safra tuzu konsantrasyonunda suşların farklı sürelerde, OD ₆₀₀ nm dalga boyunda okunan absorbands değerleri.	80
Şekil 31. LAB suşlarının %0.3 safra tuzu konstrasyonunda 24 saatlik inkübasyon sonucunda elde edilen %canlılık sonuçları.....	81
Şekil 32. Simüle edilmiş sindirim sistemi şartlarında LAB suşlarının %gelişim ve inhibisyon oranları.....	87
Şekil 33. Test edilen suşlarda GAD geninin taranması sonucu oluşan PCR görüntüsü.....	89
Şekil 34. GABA sentezinin ince tabaka kromatografisinde (TLC) ön değerlendirilmesi.....	90
Şekil 35. <i>Lb. plantarum</i> WPS-12 tarafından üretilen GABA’nın HPLC kromatogramı.....	91
Şekil 36. <i>Lb. plantarum</i> C-6A tarafından üretilen GABA’nın HPLC kromatogramı.	91
Şekil 37. <i>Lc. garvieae</i> WPS-3 tarafından üretilen GABA’nın HPLC kromatogramı.....	91
Şekil 38. <i>Lb. paracasei</i> WPS-11 tarafından üretilen GABA’nın HPLC kromatogramı.....	92
Şekil 39. <i>Lb. paracasei</i> C-7B tarafından üretilen GABA’nın HPLC kromatogramı.....	92

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

ATCC	: American Type Culture Collection
BHI	: Brain Heart İnfusion
Bp	: Base pair
°C	: Santigrat Derece
CO₂	: Karbondioksit
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
dNTP	: Deoksiribonükleotid Trifosfat
EDTA	: Ethylene Diamide Tetra Asetic Acid
EPS	: Ekzopolisakkarit
FAO	: Food and Agriculture Organization- Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	: Food and Drug Administration-Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
GRAS	: Generally Recognized as Safe-Genellikle Güvenli Kabul Edilen
x g	: Yerçekimi İvmesi
HOPS	: Homopolisakkarit
HEPS	: Heteropolisakkarit
HCl	: Hidrojen Klorür
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
HT-29	: Homo Sapines Colon Colorectal Adenocarcinoma
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
Ig A	: İmmünoglobulin A
KOB	: Koloni oluşturan birim
Kob/mL	: Mililitredeki Koloni Oluşturan Bölüm
L	: Litre
LAB	: Laktik Asit Bakterileri
log	: Logaritma
M	: Molar
MATH	: Microbial Adhesion To Hydrocarbons
mM	: Milimolar
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
MRS	: de Man Rogosa Sharpe
MSG	: Monosodyum Glutamat

NaOH	: Sodium Hydroxide
OD	: Optical Density
μL	: Mikrolitre
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PCR	: Polymerase Chain Reaction-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDA	: Patato Dextrose Agar
pH	: Asitlik ve Bazlık Birimi -Power of hydrogen
rpm	: Revolution Per Minute-Dakikadaki Devir Sayısı
spp	: Species-Tür
subsp	: Subspecies-Alt tür
TE	: Tris-EDTA
TBE	: Tris Borat EDTA
TCA	: Tricloroacetic Acid
TLC	: Thin Layer Chromatography-İnce Tabaka Kromatografisi
TSA	: Tryptic Soy Agar
TSB	: Tryptic Soy Broth
s	: Saniye
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
V	: Volt
WHO	: World Health Organization-Dünya Sağlık Örgütü

BİRİNCİ BÖLÜM

Giriş

Bağırsak sistemi besin açısından oldukça zengin olduğundan, trilyonlarca bakteriyi barındırmaktadır. Bunların büyük çoğunluğu bağırsak kolonunda yerleşmiş olup mikrobiyal habitat için belirlenen yoğunluğun yaklaşık olarak 10^{11} – 10^{12} kob/g olduğu bilinmektedir (Hooper, & Gordon, 2001). Bu ortamdaki mikroorganizmalara genel çerçevede bakıldığında konakçının normal florası olarak tanımlanmaktadır. Mikroflora içerisinde bulunan mikroorganizmalar iki grup altında incelenmekte olup konakçının bağışıklığını olumlu yönde etkileyen mikroorganizma türüne “probiyotik”, olumsuz yönde etkileyen zararlı mikroorganizma türüne ise “patojen” adı verilmektedir (Çakır, 2003). Konakçı ile mikrobiyal denge halinde olan bu organizmalar iklim değişikliği, bilinçsiz antibiyotik kullanımı, stres vs. gibi olumsuz çevre koşullarından çok kolay etkilenmektedir. Mikrobiyal dengenin bozulmasıyla konakçı sağlığı da olumsuz yönde etkilenmektedir. Bu gibi istenmeyen durumlarda beslenmeye ek olarak takviye gıdalar ve yararlı mikroorganizmaların alınması suretiyle konakçının mikrobiyal dengesinin korunması gerekmektedir.

Probiyotikler, insan ve hayvanların sağlığını teşvik etmeleri için tasarlanmış yem ya da diyet takviyeleri olarak kullanılan canlı mikrobiyal preparatlardır. Probiyotik mikroorganizmalar arasında ise Laktik Asit Bakterileri (LAB), deneysel analizlerde belirlenmiş büyük bir bakteri grubudur (Salminen *vd.*, 1998). Bilindiği üzere LAB'nin gıdalarda kullanımı uzun bir süredir devam etmektedir. Bunlar arasında *Lactococcus* ve *Lactobacillus* cinslerinin üyeleri en yaygın olarak kabul görmüş güvenli statüsüne sahip mikroorganizmalardır. Bunun yanı sıra *Enterococcus* gibi bazı LAB türlerinin patojenite etmenlerini taşıdıklarına dair bilgiler bulunmaktadır (Salminen, & Wright, 1998).

Bağırsak ekosisteminin modülasyonu ile yaşamın uzamasına yönelik yapılan teoriler üzerinden neredeyse yüzyıl geçmiştir. Bununla birlikte son zamanlarda probiyotik çalışmalarının bilimsel temeli oluşmuş ve bazı suşların klinik çalışmaları yayımlanmıştır. Böylece bazı probiyotik suşların fizyolojik ve besinsel özellikler iyice anlaşılmış olup aynı zamanda da konakçının sağlığı üzerinde teşvik edici ve koruyucu etkilerinin doğrulanması sağlanmıştır (Lee, & Salminen, 1995).

Probiyotikler, FDA (Food and Drug Administration-Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylanmış olup GRAS (Generally Recognized as Safe – Genellikle Güvenli Kabul Edilen) statüsünde olan mikroorganizmalardır. Bununla birlikte probiyotiklerin sağlığı takviye edici olarak kullanımında dikkat edilecek husus uygun doz ve spesifik probiyotik suşlar arasındaki ilişkidir (Sarowska, Choroszy-Król, Regulska-Ilow, Frej-Madrzak, & Jama-Kmiecik, 2013). Yeni probiyotik mikroorganizma seçiminde ya da genetik modifikasyona uğratılmış suşların kullanımında, bu suşların güvenliği konusunda yarar-risk oranı hesaba katılmalı ve yapılan çalışmaların dikkatle incelenmesi gerekmektedir. Ayrıca yeni probiyotikler sağlıklı insan bağırsak florasında yaygın olarak bulunan suş ve cinslerden oluşmalıdır. Bu nedenle probiyotik mikroorganizmaların konakçı sağlığı üzerinde yan etkisi olmaması adına bütün özellikleri karakterize edilmelidir (Salminen, & Wright, 1998). Çünkü bazı probiyotiklerin sağlığı teşvik etmeleri türe bağımlılık göstermektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda, sağlık üzerine probiyotiklerle ilgili bağırsak rahatsızlıklarını onarmaya yardımcı ya da korunmasını sağlandığı yönünden birçok iddialarda bulunulmuştur. Ancak bu etkinin sadece klinik şartlar altında ve rasgele seçilmiş plasebo-kontrollü bazı suşlarda olduğu gözlemlenmiştir (Marteau, Vrese, Cellier, & Schrezenmeir, 2001).

Probiyotiklerin yararlı etkileri geçen yüzyılın başında ilk defa Nobel ödüllü Rus bilim adamı Elie Metchnikoff tarafından ortaya atılmıştır. Yaşlanma üzerine bir takım çalışmalar yapan Rus araştırmacı yaşamı boyunca uzun ömürlü olmayı LAB içeren yoğurt alımına bağlı olduğunu savunmuştur (Metchnikoff, 1907). Metchnikoff, yaptığı gözlemlerle bir dönüm noktası niteliği taşıyan bilgiler ortaya attığından dolayı probiyotiğin babası olarak kabul edilmektedir. Bu araştırmacı yoğurt gibi fermente süt ürünlerinin düzenli bir şekilde tüketimi ile daha sağlıklı ve uzun ömürlü olma arasında pozitif bir ilişki olduğunu öne sürmüştür. Bunun üzerine Bulgar Doktor Stamen Grigorov immün sistemi iyileştirici etkisinin yoğurttaki sağlıklı bakteriler ile ilişkili olduğunu keşfetmiştir (Anukam, & Reid, 2007). Bağırsak mikroflorası bakteriyel koleksiyon açısından en yoğun ve çeşitliliği oluşturması nedeniyle konakçının gastrointestinal sistem mikroflorasında bazı biyokimyasal, fizyolojik ve immünolojik özellikler meydana gelmektedir. Nitekim bağırsak florasında bulunan probiyotik mikroorganizmalar patojenik mikroorganizmalar tarafından oluşturulan kolonizasyon riskini azaltmakta ve böylece bağırsak rahatsızlıklarının oluşumuna engel olmaktadır (Tannock, 1999). Yapılan birçok çalışmada enterik enfeksiyonların tedavisinde antibiyotiklerin kullanımına alternatif olarak probiyotiklerin kullanımı ile hastalıklar üzerindeki probiyotiklerin etkinliği gösterilmiştir (Marteau *vd.*, 2001). Konakçı tarafından alınan probiyotiklerin hayatta kalması gastrointestinal sistemde bulunan suşlar arasında farklılık göstermektedir. Bazı suşlar midede hızlıca ölürken,

Bifidobacteria ve *Lactobacillus acidophilus* gibi mikroorganizmalar tüm sindirim boyunca çok yüksek konsantrasyonda bağırsak sisteminden canlı olarak geçmektedir (Marteau, 1993).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarla probiyotik takviyesi yapılmış ürünlerin insan ve hayvanların beslenmesinde fonksiyonellik kazandırdığı bildirilmektedir. Özellikle de fermente edilecek süte probiyotik mikroorganizma ilavesiyle tüketici bünyesinde bağışıklık fonksiyonunun arttığı ve böylece hastalanma potansiyelinin azaldığı yönünde çalışmalar yürütülmüştür (Demirgöl, & Sağdıç, 2018). Ayrıca probiyotik ilavesi yapılmayan fermente süt ürünleri de probiyotik mikroorganizma bakımından oldukça zengin bir kaynak olarak değerlendirilmektedir. Ürünlerde kullanılacak probiyotik türler de suş bazında büyük farklılıklar görülmekte olup özgün türlerin genel olarak yerel ve geleneksel ürünlerden izole edilebileceği hususu üzerinde durulmaktadır.

Ticari olarak satılan suşlardan antimikrobiyal, antifungal, düşük pH ve safra tuzu gibi etkilere karşı tek başlarına kullanımlarında ya da birlikte kullanıldıklarında antagonistik etki göstererek her zaman istenilen etkilerin tümünü gösteremedikleri belirlenmiştir. Bu yüzden yapılan çalışmalarla probiyotiklerin farklı kombinasyonları uygulanarak pazara sunulması tüketici açısından daha sağlıklı olmakta ve yeni mikroorganizmalara ihtiyacı ortaya çıkarmaktadır. Ülkemiz fermente ürün üretimi açısından geniş bir coğrafyaya sahip olduğundan dolayı ciddi anlamda bu ürünlerin toplanıp LAB'ların tanımlanması ve suşların karakterizasyonunun yapılması hem dışa bağımlılığın azaltılmasında hem de ülkemizde kültür koleksiyonunun oluşmasının sağlanmasında ümit verici bir durum olarak görülmektedir.

Bu tez kapsamında daha önceden ekşi hamur ve bebek dışkısından izole edilip tanımlanan LAB suşlarının *in vitro* koşullar altında incelenerek probiyotik olabileceği düşünülen suşların açığa kavuşturulması amaçlanmaktadır. Elde edilen verilerin değerlendirilmesiyle, endüstriyel açıdan önem arz eden suşların gıda formülasyonları gibi farklı çalışmalarda kullanılacak potansiyel probiyotiklerin üretimine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

İKİNCİ BÖLÜM

Kaynak Özetleri

Probiyotiğin Tanımı ve Tarihçesi

Probiyotik Yunanca “pro” ve “biota” kelimelerinden türetilmiş olup “yaşam için” (antibiyotik karşıtı) anlamına gelmektedir (Hamilton-Miller, Gibson, & Bruck, 2003). Probiyotik terimi 1954 yılında Ferdinand Vergina tarafından tıbbi terminolojiyle ortaya çıkarılmış ve bu araştırmacı “Anti- und Probiotika” adlı makalesinde “probiotika” adı verilerek pozitif etki gösteren bakteriler ile bağırsak mikroflorası üzerinde olumsuz etki gösteren antibiyotikler ve diğer antimikrobiyal preparatların kıyaslamasını yapmıştır (Sarowska vd., 2013). Bunun üzerine birkaç yıl sonra Lilly ve Stillwell tarafından probiyotikler, diğer mikroorganizmaların gelişimini stimüle eden mikroorganizmalar olarak tanımlanmıştır (Holzapfel, & Schillinger, 2002). Yirminci yüzyılın ikinci yarısında bir takım çalışmalar yürütülmüş ve bu çalışmalar sonucunda bilim adamları probiyotik kavramını “yeterli miktarda alındığı takdirde konakçının sağlığı üzerinde yararlı etkileri olan canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlamışlardır (FAO, 2002). Fuller (1989) ise, intestinal mikroflorayı olumlu yönde etkileyerek konakçının sağlığını teşvik eden gıda katkı maddeleri şeklinde tanımlamıştır. Bu tanımlı yaparken gıdada kullanılacak her bir suşun üründeki etkinliğine ve güvenliğine dikkat edilerek incelenme hususunun önemine değinmiştir.

Probiyotik olarak seçilen suşlar çoğunlukla *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerine ait olmakla beraber kullanımı giderek artmaktadır (Ravula, & Shah, 1998). Probiyotik tür seçiminde LAB türleri bu mikroorganizmaların büyük bir kısmını oluştururken bazı *Bacillus* ve maya suşları da uygun aday probiyotik niteliği taşımaktadır (Gueimonde, & Salminen, 2006). Seçilen bu probiyotikler genellikle konakçının gastrointestinal florasını bozan spesifik faktörlerden kaynaklı hastalıkları hedefleyerek kullanılmıştır. Bu hastalıklara antibiyotik kullanımına bağlı olarak oluşan diyare, psödomembranoz kolitis ve ince bağırsakta meydana gelen bakteriyel büyüme örnek verilebilir. Mikrobiyal dengesi bozulan floranın normal halini alıncaya kadarki geçen süreçte probiyotiklerin sağlığı teşvik edici özellikler gösterdiği öne sürülmüştür (Rolfe, 2000).

Konakçının sağlığını teşvik edip terapötik etkisini ortaya çıkarabilmek için ürünlerde bulunan probiyotik içeriğinin tüm raf ömrü boyunca yeterli sayıda canlı mikroorganizma

içermesi gerekmektedir (Ravula, & Shah, 1998). Aynı zamanda ise yutulduktan sonra gastrointestinal sistem boyunca mide ve safra asitleri gibi olumsuz koşullara karşı aktivitesini yitirmeden canlılığını devam ettirebilmelidir. Yapılan sayısız *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, fırsatçı ve patojenik mikroorganizmalara karşı probiyotiklerin bağırsak florasında bariyer görevi gördüğünü bildirmiştir (Fuller, 1991).

Probiyotikler gıda ürünlerinde diyet takviyesi olarak kullanılmaktadır. Birleşik devletlerde insan kullanımı için probiyotik ilaçlar üretilmemesine rağmen, Tarım Bakanlığı tarafından onaylanmış hayvan sağlığına dönük olarak mikrobiyal preparatlar ticari pazarda yerini almış durumdadır. Amerika Birleşik devletlerinde ise probiyotik bakteri içeren gıda ürünleri çoğunlukla süt ürünleridir. Ürettikleri yoğurdun yaklaşık %80'inde probiyotik özellik gösteren *Lb. acidophilus* bulunmaktadır. Bazı ürünler de ise, ayrıca *Bifidobacterium* ilavesi yaparak pazara sunmaktadırlar (Sanders, 2003). Dünya genelinde ise probiyotikli yoğurt (*Acidophilus-Bifidus*) üretimi ve pazarlanmasında artış görülmektedir. Ancak probiyotiklerin bilimsel doğruluğunun saptanabilmesi ve akabinde bu uygulamaların giderek artış gösterebilmesi için konakçı ile mikroorganizma arasındaki ilişki açısından endüstriyel çalışmaların desteklenmesi gerekmektedir (Tannock, 1997).

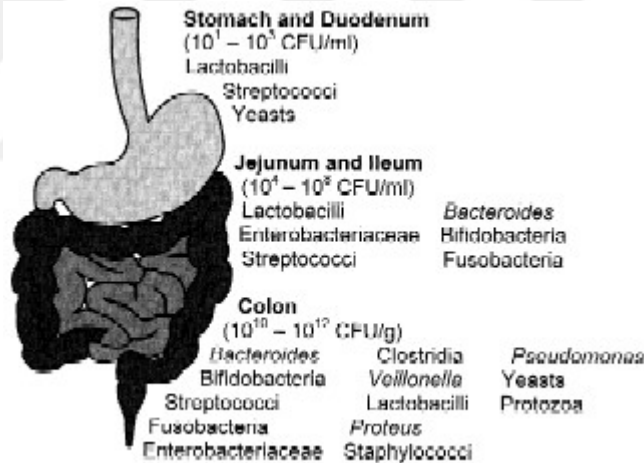
Probiyotik olarak kullanılan LAB; gıda alerjileri, enflamatuvar bağırsak hastalıkları, kabızlık, laktoz intoleransı, rotavirüs ve diğer enterik patojenlere bağlı akut gastro-enterit gibi bağırsak rahatsızlıklarını yönetme kabiliyetine sahiptirler (Gilliland, 1990; Isolauri, Jalonen, Juntunen, Rautanen, & Koivula, 1990; Salminen, Elomaa, Minkkinen, Vapaatalo, & Salminen, 1988; Salminen, Isolauri, & Salminen, 1996a). Bu tür rahatsızlıkların önlenmesi için seçilen probiyotiklerin gastrointestinal sistemde kolonize olarak çeşitli patojenlerin yerleşmesini engellemeleri hedeflenmektedir (Forestier, De Champs, Vatoux, & Joly, 2001; Lu, & Walker, 2001).

Bağırsak Sisteminin Mikroflorası

İnsanların bakteriyel florası kimyasal çevre ile etkileşime girmesinden dolayı en özel kısım olarak nitelendirilmektedir. Gastrointestinal sistemin mikroflorası yüksek karmaşıklığı temsil eden bir ekosistem olması sebebiyle bu sistem hakkında elde edilen bilgiler sınırlı düzeydedir (Berg, 1996). Tüm memeli türlerinin bağırsak sistemi kompleks mikroorganizma topluluğundan oluşmakta olup mikroflorasında çoğunlukla anaerobik türlerin barındırdığı bilinmektedir (Tannock, 1995). 1960'lı yılların başında gastrointestinal sistemin farklı kısımlarında mikrobiyal popülasyonun üzerinde ayrıntılı bir şekilde çalışma yapılarak veriler ortaya çıkarılmıştır (Lerche, 1962; Reuter, 1965a, 1965b, 1969).

Aynı bireylerin farklı dışkılarından sayıca baskın cinsler tespit edilirken bakteriyel türlerinin popülasyonunda büyük çeşitlilik görülmektedir (Moore, Cato, & Holdeman, 1978). Bakteriyel kompozisyonun gastrointestinal sistem boyunca önemli oranda farklılıklar göstermesiyle birlikte mide de asidik şartlardan dolayı total bakteri sayısı genellikle 10^3 kob /g altında olmaktadır (Gibson, & Macfarlane, 1995).

Mikrobiyal topluluktaki çeşitlilik hem gastrointestinal sistemdeki bir dizi karmaşıklıktan hem de stres, diyare, ilaç kullanımı gibi çevresel etmelerden dolayı etkilenmektedir. Ağız boşluğunun nötre yakın pH'sından sonra midenin düşük asitliğinde çoğu mikroorganizma zarar görmektedir. Bu sebeple Şekil 1'de görüldüğü gibi, ortam streptokoklar ve laktobasiller gibi Gram pozitifler tarafından domine edilmektedir. Ayrıca şekilde de gösterildiği gibi, gastrointestinal sistem farklı kısımlardan oluştuğundan dolayı mikroorganizma türünde de bölümsel farklılıklar nedeniyle çeşitlilik görülmektedir. Duodenum da mikroorganizmaların yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmeleri yönünden safra ve pankreatik sıvıların, istenmeyen ortamı oluşturması nedeniyle düşük oranda canlı mikroorganizma kalmaktadır (Lerche, 1962; Reuter, 1965a, 1965b).



Şekil 1. İnsan gastrointestinal sistem mikroflorasının dağılımı (Holzapfel, Haberer, Snel, Schillinger, & Veld, 1998).

İnsan kalın bağırsağının mikrobiyal popülasyonu oldukça yoğun bir ortamdır. Bu bakterilerin çoğu mutlak anaerobik olmakla beraber gram negatif fakültatif anaerob patojenleri içermektedir. Örneğin *Enterobacteriaceae* familyasından *Escherichia coli* genellikle karakteristik bağırsak bakterisi olarak bilinmektedir (Gibson, & Macfarlane, 1995). Gastrointestinal sistemde bulunan bakteriyel çeşitlilik Tablo 1'de gösterilmiştir. Doğum ile birlikte kalın bağırsağın mikroflorası oluşmaktadır. Başlangıçta fakültatif anaerobik suşlar ortamı domine ederken daha sonra uygulanan farklı diyet tiplerinde dolayı büyük ölçüde türlerin bileşim kompozisyonunda değişimler meydana gelmektedir. Anne sütüyle beslenen

bebeklerin fekal florasında bifidobakteriler hâkimiyet gösterirken, bu durumun tam tersi olarak farklı formülasyonlar ile oluşturulmuş ürünler tüketen bebeklerin gaitası bifidobakteri, bakteriodes ve streptokoklar gibi kompleks bir mikrobiyotaya sahiptir (Ducluzeau, 1993).

İnsan bağırsak mikroflorasının kontrolünde laktobasillerin önemli bir rolü olduğuna inanılmaktadır. Laktobasiller ve bifidobakteriler probiyotik olarak davranmasıyla birlikte kolonik bakteri dengesini sağlayarak konakçı üzerinde olumlu etkiler oluşturmaktadırlar (Fuller, & Gibson, 1997). Laktobasillerin yutulmasıyla beraber intestinal flora değişebilmekte (Clements *vd.*, 1981; Clements, Levine, Ristaino, Daya, & Hughes, 1983; Shahani, & Ayebo, 1980; Watanabe, Morotomi, Kawai, & Mutai, 1977) ve bu laktobasiller de sağlıklı anneden emzirilen bebeklerin gastrointestinal sistemine doğrudan geçerek kolonize olabilmektedirler (Benno, Sawada, & Mitsuoka, 1984). Bununla beraber sağlıklı fetüs doğumdan önce steril olarak kabul edilirken, doğum sırasında veya sonrasında sindirim kanalında mikroorganizmalar edinebilmektedir. Ancak bebeğin bağırsağındaki laktobasillerin ortama nasıl kolonize olduğuna dair bilgiler yetersiz kalmaktadır (Grönlund, Lehtonen, Eerola, & Kero, 1999; Long, & Swenson, 1977; Tannock, Fuller, Smith, & Hall, 1990).

Tablo 1. *Sindirim Sisteminde Sıklıkla Karşılaşılan Mikroorganizmalar* (Çakır, 2003)

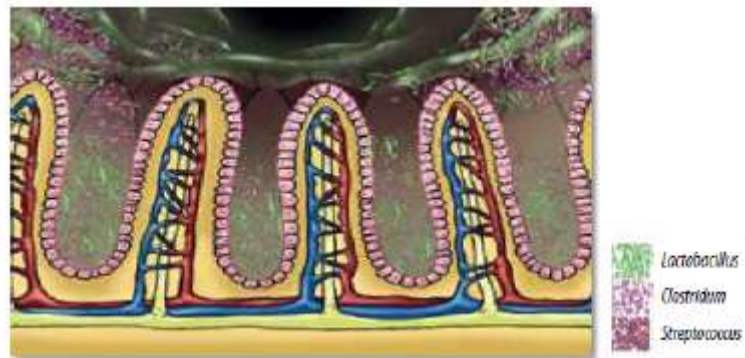
Sindirim sisteminde bulunan kısım	Baskın bakteriyel flora
Ağız boşluğu	<i>Lactobacillus, Bacteriodes, Fusobacterium</i>
Yutak	<i>Lactobacillus, Bacteriodes, Fusobacterium Veillonella</i>
Mide	<i>Streptococcus, Enterococcus, Lactobacillus, Fusobacterium</i>
Duodenum	<i>Streptococcus, Enterococcus, Lactobacillus, Veillonella, Eubacterium</i>
Jejunum	<i>Eubacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Veillonella</i>
İnce Bağırsak	<i>Enterococcus, Lactobacillus, Eubacterium Veillonella</i>
Kör bağırsak	<i>Peptostreptococcus, Bifidobacterium, Bacteriodes, E.coli, Eubacterium, Clostridium, Lactobacillus Fusobacterium</i>
Kalın Bağırsak	<i>Peptostreptococcus, Bifidobacterium, Bacteriodes, E.coli, Eubacterium, Clostridium, Lactobacillus Fusobacterium</i>
Anüs	<i>Peptostreptococcus, Bifidobacterium, Bacteriodes, E.coli, Eubacterium, Clostridium, Lactobacillus Fusobacterium</i>

Bazı LAB suşları insan ekosisteminde, vajina, ağız boşluğu gibi farklı bölümlerde yer alarak yararlı etkiler oluşturabilmektedir. Bu durum probiyotiklerin neden uygulandıklarını açıklamaktadır. Yapılan bir takım çalışmalarda insan gastrointestinal sistemi ile ilişkili tipik laktobasilleri tanımlamış ve konakçıdaki homofermatif laktobasilleri 3 grup altında incelemiştir. Bunlar “*Lb. acidophilus, Lb. salivarius* ve *Lb. casei*” olarak varsayılmış ve daha sonra insan gastrointestinal sistemiyle ilişkili olarak önemli olan laktobasillerden “*Lb.*

fermentum ve *Lb. reuteri*'' adlı mikroorganizmalar tanımlanmıştır (Reuter, 1965a, 1965b, 1969).

Probiyotikler yeterli miktarda alındığı takdirde gastrointestinal mikrobiyotada özellikle *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerine ait suşlar ortamı domine eden gruplar arasında yer almaktadır (Guarner, & Malagelada, 2003). Hakimiyet gösteren *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsleri probiyotik mikroorganizmaların en önemli taksonları arasında yer almaktadır. Probiyotik potansiyeli taşıyan mikroorganizmalar yutulduğu zaman metabolik aktivite gösterebilmesi için yeterli sayıda alındığında gastrointestinal sistemdeki bazı engelleri aşmalı ve geçici olarak da olsa yararlı etkiler gösterebilmelidir (Clara vd., 2011). Probiyotikler yutulduktan sonra mide de bulunan gastrik enzimlerden dolayı oluşan son derece düşük pH'nın ardından, pankreatin ve safra tuzları ile karşı karşıya kalmaktadırlar. Yaşamsal faaliyetlerinin sürdürerek sağlığı teşvik etmeleri açısından potansiyel probiyotiklerin bu tür engellere karşı direnç göstermesi gerekmektedir (Masco, Crockaert, Van Hoorde, Swings, & Huys, 2007).

Konakçı ile intestinal mikroflora arasında simbiyotik bir ilişki vardır. Bu durum her iki taraf içinde karşılıklı avantaj olarak değerlendirilmektedir. Özellikle de intestinal sistemdeki bazı bakteriler konakçı ile interaksiyona girerek, patojenik özellik gösteren mikroorganizmaların kolonizasyonunu önleme ve normal mukozal immün sistemin gelişimine yardımcı olma gibi çeşitli fonksiyonların oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Falk, Hooper, Midtvedt, & Gordon, 1998; Sartor, 2008). Şekil 2'de bağırsak mikroflorasında kommensal yaşam süren mikroorganizmaların jejunum-ileum bölgesindeki gösterimi verilmiştir. Söz konusu olan bakteri-konakçı etkileşiminin değişmesi halinde kommensal bakteriler patajoniteye eğilim göstererek bağırsak hastalıklarının oluşumuna yol açabilmektedir (Ojetti vd., 2009).



Şekil 2. Jejunum-ileum bölgesinde bulunan mikroorganizmalar (Conrad, & Vlassov, 2015).

Genellikle yoğurt, fermente gıdalar ve et ürünleri üzerinde yapılan bir takım çalışmalarda, probiyotik olarak kullanılan bifidobakteri ve laktobasil cinslerin gıdaya takviye

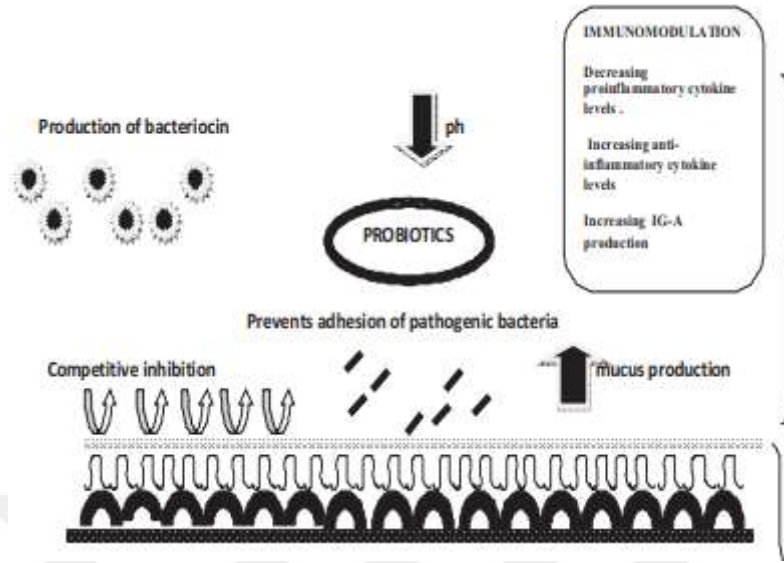
edildiğinde bağırsaklara kolonize olma yeteneğine sahip oldukları gösterilmiştir (Salminen *vd.*, 1996a; Salminen, Isolauri, & Salminen, 1996b; Salminen *vd.*, 1996). LAB, fermente ürünlerin oluşumunda başlıca rol oynamaktadır. LAB tarafından üretilen bir diğer fermente ürün olan ekşi hamur, fermente edilebilir karbonhidratlar bakımında oldukça zengindir ve başlangıçta pH 5.0-6.2 değerine sahip olmaktadır. Bu nedenle tahıl ürünlerinden ve hazırlanma şartlarından dolayı karakteristik LAB türlerinin gelişimine olanak sağlamaktadır (De Vuyst, & Neysens, 2005). Spontan fermantasyon sırasında, homofermantatif laktobasiller (*Lb. casei*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. farciminis*, *Lb. plantarum*), heterofermantatif laktobasiller (*Lb. brevis*, *Lb. buncheri* ve *Lb. fermentum*) ve *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* gibi LAB türleri ortamı hakimiyet altına alarak Gram negatif türlerin gelişimini engellemektedirler (Stolz, 1999). Ayrıca ekşi hamur karbonhidrat bakımında zengin olmasının yanı sıra ortamı domine eden LAB türleri tarafından Ekzopolisakkarit (EPS) üretimi de söz konusu olabilmektedir. Ekşi hamur kaynaklı LAB türlerinin genellikle glukon ve fruktan tipi EPS ürettikleri bildirilmiştir (Bounaix *vd.*, 2009).

Lactobacillus ve *Bifidobacterium* türleri gelişmiş ülkelerde probiyotik kültürlerin önemli bir kısmını oluşturmaktadır (Fuller, 1992). Özellikle gıdalarda uygulanabilirlik açısından hafif asitli yoğurt üretimi bağırsakta beklenen kolonizasyon sağladığından dolayı 1960 yılının sonlarına doğru Almanya’da “*Lb. acidophilus*” ve “*Bifidobacterium bifidum*” türleri tanıtılmıştır. İnsan orjinli LAB türlerinin Almanya’da 20, Japonya’da ise en az 40 yıldan daha fazla bir süreyle fermente süt ürünlerinde kullanımı söz konusudur (Schuler-Malyoth, Ruppert, & Müller, 1968). Metabolizmada aktif rol oynayan karbonhidrat fermantasyonu kısa zincirli yağ asitlerine neden olmaktadır. Kısa zincirli yağ asitleri fermantasyonun ana ürünleri olup, fermantasyon boyunca bağırsak mikroflorasındaki mikroorganizmalar tarafından üst bağırsakta sindirilmeyen karbonhidratlardan elde edilen enerji olarak değerlendirilmektedir (Cummings, 1997).

Probiyotik Mikroorganizma ile Konak Hücre Arasındaki Etkileşimi

Konakçığı bağırsak hastalıklarından korumak için probiyotiklerle ilgili çeşitli mekanizmalar önerilmektedir. Probiyotikler, mikroflorayı modifiye ederek salgılamış oldukları bileşenlerle antimikrobiyal etki göstermeleri, patojenler ile bağırsak mukozasına yapışmada rekabet halinde olmaları, patojenlerin yaşamsal faaliyetleri için gerekli besinler ile kullanma konusunda rekabet etmeleriyle konakçının sağlığını olumsuz yönde etkileyen patojenlerinin gelişimini minimize etmektedirler (Vogelsang, Ferenci, & Gangl, 1987)(Şekil 3). Özellikle LAB’lar bakteriyosin, hidrojen peroksit (H₂O₂) ve organik asit gibi ürettiği inhibitör maddelerle patojenik mikroorganizmaların ürettiği metabolitleri ya da bakteriyel metabolizmayı inhibe

etmektedirler (Singh, & Bunger, 2014). Böylece patojenlerin neden olduğu bağırsak hastalıklarına karşı koruyucu etki gösterebilmektedirler.



Şekil 3. Probiyotik mikroorganizmaların etki mekanizması (Singh, & Bunger, 2014).

Probiyotiklerin, enfeksiyonu önleyebileceği birçok mekanizma ile açıklanmaya çalışılmıştır. Probiyotikler, gıdanın besin değerini artırmakta ve antimikrobiyal maddelerin üretimiyle birlikte bağırsak sistemimizde yer alan patojenik mikroorganizmalara epitelyal inhibisyon sağlayarak mukozal yapışmayı engellemektedirler. Ayrıca ortamda bulunan sınırlı besin maddeleri için rekabet içerisinde olarak patojenlerin istilasını engelleyerek bağırsak mikrobiyotasının modülasyonunu sağlamaktadırlar (Wan, Chen, Shah, & El-Nezami, 2016). Probiyotiklerin etki mekanizması suşa bağımlılık göstermektedir. Bireysel probiyotiklerin seçilerek bilimsel olarak karşılaştırılması hayati önem taşımaktadır. Bununla birlikte mekanizmalar molekül türüne ya da doğrudan hücre-hücre temasına dayanmaktadır (Jonkers, 2016). Yapılan bir takım çalışmalarla probiyotik mikroorganizmaların insan vücudunda oluşturduğu yararlı etkiler aşağıda verilmiştir (Czerwionka-Szaflarska, & Romańczuk, 2008; Madaliński, & Szajewska, 2004) :

- Bağırsak enfeksiyonlarının önlenmesi
- Laktoz toleransını artması
- İmmün sistemin gelişmesi
- Anti-alerjik etki
- Kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi
- Kanser oluşumunun önlenmesi
- Reseptörlere ya da endotel hücrelere yapışmak için rekabet etmekte ve böylece bağırsak epitelinin patojenlere karşı korunması sağlanmak (Servin, 2004)

- Antimikrobiyal bileşik üretimi (Elmer, 2001)
- Besin için diğer mikroorganizmalarla rekabet halinde olmak (Ruszczyński, Radzikowski, & Szajewska, 2008)

Konakçı üzerinde yaptığı bu etkinin potansiyel sebebi olarak hem mikrop-mikrop hem de mikrop-konak hücre etkileşiminin muhtemel olduğu düşünülmektedir. Bu konu ile ilgili yapılan bir çalışmada patojenlerin faaliyetleri sonucu oluşan zararlı etkilerin engellenmesine yönelik mikrop-mikrop etkileşimlerine odaklanılmış durumdadır (Servin, 2004). Son zamanlarda yapılan çalışmalar laktobasillerin Peyer plakları ile interaksiyona girebildiğini bildirmiştir (Plant, & Conway, 2001). Mukozal bariyer fonksiyonunun probiyotik modülasyonu, müsin salgısının ve bağlantı fonksiyonunun artması, epitel hücrelerin apoptozunun düzenlenmesi gibi çeşitli mekanizmaları içermektedir. Örneğin yapılan bir çalışmada, *Lb. rhamnosus* GG nin epitel hücrelerinde sitokin indüklenmesi ile birlikte epitel bariyer hücrelerini modüle ettiği görülmüştür (Tao vd., 2006; Yan, & Polk, 2002).

Probiyotiklerin Güvenlik Kriterleri

Kimyasal ajanlar vasıtasıyla oluşan hastalıklardan ziyade gıdalardaki mikrobiyal ajanların bilinmemesinden dolayı meydana gelen hastalıklarında tahmini zor olmaktadır (Tang, Foubister, Pucciarelli, & Finlay, 1993). Dolayısıyla kanıtlanmış faydalı mikroorganizmalar ile karşılaşılan problemler bireyden bireye göre değişkenlik göstereceğinden tahminde bulunma zor olacaktır. Gıdalardaki patojenik mikroorganizmalarla yapılan bir takım çalışmalar sonucunda hiçbir risk oluşturmama durumu ile karşılaşılmamıştır. Etketif dozun etkinliği önem arz etmekle birlikte hem deney hayvanlarında hem de insanlar arasında konak hücre ve mikrobiyal popülasyonda bireysel farklılıklardan dolayı minimum enfektif doz oranını belirlenmesi uygunluk göstermemektedir (Salminen, & Wright, 1998). Yapılan bazı araştırmalar sonucunda *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Streptococcus* gibi cinslerin enfeksiyona sebep olduğu rapor edilmiştir (Donohue, & Salminen, 1996).

Probiyotik mikroorganizmaların güvenlik kriterlerinin belirlenmesinde dört yaklaşım mevcuttur. Bunlar:

- a) insan gastrointestinal sisteminde hem mukozal yüzeylerdeki hemde intestinal sistemdeki probiyotik mikroorganizmaların varlığı ve doğal oluşum şekilleri üzerine yapılan çalışmalar,
- b) suşların yapısal özellikleriyle ilgili yapılan çalışmalar,
- c) her bir suşun doza bağlı cevabı ve farmokokinetik özellikleri üzerine yapılan çalışmalar ve

d) insan-konak hücre ve suş arasındaki etkileşimin araştırılması (Salminen, & Wright, 1998).

LAB'ın birkaç suşunun kimyasal değerlendirmesini yapmak için bu suşlarda aynı prosedürleri uygulayarak akut toksisite çalışması yürütülmüş ve çalışma sonucunda akut toksisite özelliğine rastlanılmamıştır (Donohue, & Salminen, 1996). Sindirim sisteminde antimikrobiyal etki gösteren safra tuzları kolon da kimyasal modifikasyona uğramakta böylece hücre membranına zarar vererek inhibisyon oluşumuna neden olmaktadır (Bilginer, & Çetin, 2019). Safra tuzunun aşırı dekonjugasyonu ve mukusun degradasyonu gibi bazı enzimatik özellikler ile konakçıda potansiyel zarar oluşturabilmektedir. Bu gibi özellikler *in vitro* çalışmalarda yer aldığı takdirde daha fazla fikir sahibi olmak artık daha kolay olmaktadır (Donohue, Salminen, & Marteau, 1998).

Gastrointestinal sistemde probiyotiklerin yaşamsal mücadelesinde onların translokasyon ve kolonizasyon özelliklerinin bilinmesiyle sadece pozitif etki göstermeleri değil, yan etkilerinin de bilinmesi açısından bu bilgilere ihtiyaç vardır. Probiyotik tüketimi söz konusu olduğunda vücuda alınan aynı türlerin gastrointestinal sistemin herhangi bir bölümündeki canlılığı değerlendirilmek istense bile suş bazında farklılık göstermektedir (Marteau, 1993; Pettersson, Graf, & Sewelin, 1983).

Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar

Probiyotik mikroorganizma açısından süt ve süt ürünleri çok iyi bir kaynak olarak görünmesi nedeniyle, son zamanlarda yapılan çalışmalarda fermente süt ürünlerinin bağırsaktan geçişi esnasında yaşamsal faaliyetlerinde ne gibi değişiklikler olduğuna dair çalışmalar yürütülmüştür (Bezkorovainy, 2001; Liang, 2011). Genellikle probiyotikli yoğurt üretiminde canlı mikrobiyal gıda katkıları olarak probiyotik mikroorganizmaların kullanımı yapılmaktadır. Probiyotik ilavesi yaparken patojenik özellik göstermeyen, tüketim sonrası canlılığını kaybetmeden metabolik aktive göstererek konakçının sağlığını olumlu yönde etkileyen mikroorganizma seçimine dikkat edilmesi gerekmektedir (Akalin, Gönç, & Senderya, 2000). Seçilen probiyotik mikroorganizmalar genellikle bakteri ya da maya olmakta fakat çoğunluk olarak bakterilerin varlığı ön plana çıkmaktadır (Singh, & Bunger, 2014). Probiyotik özelliği taşıyan bazı mikroorganizmalar Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Probiyotikli Ürünlerde Yaygın Olarak Kullanılan Probiyotik Mikroorganizmalar (Singh, & Bunger, 2014)

LAKTOBASİLLER	BİFİDOBAKTERİLER	DİĞER BAKTERİLER	MAYALAR
<i>Lb. acidophilus</i> spp.	<i>B. bifidum</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Lb. acidophilus</i> La-1 <i>Lb. casei</i> spp.	<i>B. breve</i> <i>B. infantis</i>	<i>E. coli</i> Nissle 1917 <i>Sterptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	
<i>Lb. rhamnosus</i> GG <i>Lb. reuteri</i> <i>Lb. plantarum</i> spp. <i>Lb. fermentum</i> KLD <i>Lb. johmsonii</i>	<i>B. longum</i>		

Probiyotik laktobasiller.

Probiyotik laktobasillerin uygulanmasına yönelik sağlık teşvikinin altında yatan mekanizma bu üç varsayımla değerlendirmeye alınmaktadır (Boyle, & Tang, 2006; Fedorak, & Madsen, 2004; Marco, Pavan, & Kleerebezem, 2006). Bunlar:

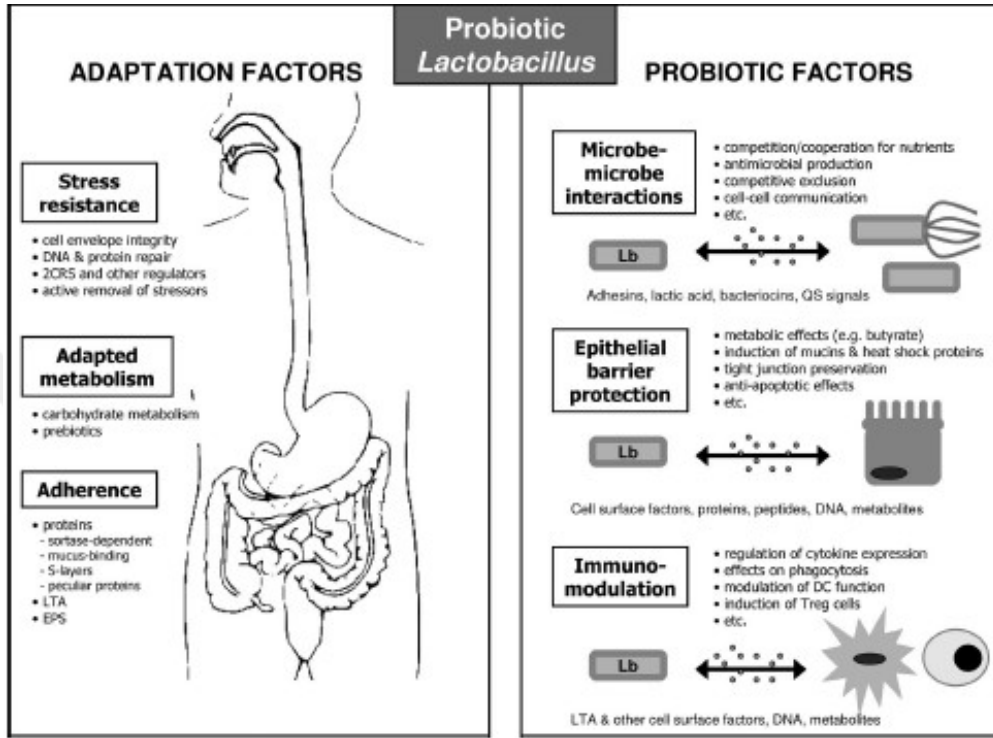
a) mikrop-mikrop interaksiyonu sayesinde mikrobiyal homeostaz ve patojen inhibisyonu,

b) epitel bariyer fonksiyonunun artması ve

c) immünolojik tepkiler,

olarak incelenmektedir. Laktobasiller, patojen mikroorganizmaları inhibe ettiğinden dolayı yüzyıllar boyunca gıdaların korunmasında ve mikrobiyal bozulmayı önlemede kullanılmaktadır. Son zamanlarda ise, Laktobasillerin immünostimülatör ve immünoregülatör olduğu konusunda araştırmalar yapılmaktadır. Gastrointestinal sisteme probiyotikler çoğunlukla yiyecek, içecek veya ilaç yolu ile alınmaktadır. Birçok gıda ile vücuda alınan toksin ve patojenler bağırsak duvarında hasara neden olmakta ve bu durumun probiyotik takviyesi ile azaltılabileceği bildirildiğinden dolayı giderek ilgi çekmektedir. Probiyotik laktobasillerin farklı suşlarının konak hücrede oluşturduğu tepkiler farklı şekilde belirti göstermektedir. Dolayısıyla *Lactobacillus* suşu ile elde edilen verilerle bir genelleme yapılması doğru olmamaktadır. Bu türler üzerinde moleküler araştırma yapılmak istenirse suşa özgü özelliklerin dikkate alınması gerekmektedir. Probiyotik niteliği taşıyan farklı *Lactobacillus* suşlarının belirli yüzey moleküllerinin eksprese edilmeleri veya konakçı ile doğrudan etkileşime girmesi farklı olaylar ile ilişkilendirilmektedir (Lebeer, Vanderleyden, & De Keersmaecker, 2008). Yapılan birçok klinik araştırmalar kapsamında probiyotik suşların moleküler karakterizasyonu son derece önem arz etmektedir. Çalışmalarda probiyotik mikroorganizmalarda odaklanılan moleküler kriter, en iyi koşulları sağlayarak istenilen nitelikte ki probiyotik suşların eldesidir.

Probiyotik mikroorganizma seçiminde bazı laktobasillerin, lizozim enzimine, mide asidine ve safraya karşı dayanıksız olmalarından dolayı uzun süre canlı kalabilmeleri zordur. Bu yüzden probiyotik laktobasillerin optimum şekilde çalışabilmesi için, konak hücre de geçici olarak karşılaştıklarında optimum adaptasyon şartlarının oluşması ve sağlığı doğrudan etkileyen faktörlerin konakçı tarafından dikkate alınması gerekmektedir (Şekil 4)(FAO/WHO, 2001).



Şekil 4. Laktobasiller tarafından oluşturulan probiyotik etkinin mekaniksel görünümü (Lebeer vd., 2008).

Laktobasillerin karşılaştığı olumsuz durumlardan olan asit ve safra tuzuna karşı aktivitesini yitirmemesinin yanı sıra, yaşamsal faaliyetlerini devam ettirme çabaları için diğer stres durumlarına karşı oluşturduğu etkinin gastrointestinal sistemdeki katkısı göz ardı edilmeyecek kadar büyük öneme sahiptir (Bezkorovainy, 2001). Laktobasillerin hücre duvarındaki makromoleküllerin çeşitli stres durumlarında hücre bütünlüğünü koruduğuna dair bilgiler tespit edilmiştir. Ayrıca Mikroarray teknolojisi kullanılarak bazı Laktobasillerin genetik faktörleri ortaya çıkarılmıştır. Örneğin; asit şokundan sonra pH 2.7'ye geldiğinde *Lb. reuteri* ATCC 55730, fosfostidil gliserofosfotaz enzimini kodlayan genin iki-üç kat daha fazla indüklendiği görülmüştür (Wall vd., 2007). Benzer şekilde safra tuzu etkisi ile *Lb. reuteri* CRL 1098' in lipit hücre duvarında değişiklik meydana getirdiği tespit edilmiştir (Taranto, Fernandez Murga, Lorca, & de Valdez, 2003).

Probiyotik Mikroorganizmaların Seçim Kriterleri

Probiyotik etkinin immün sisteme ya da endojen floraya modülasyonu doğrudan/dolaylı etkili olabilmektedir. Probiyotiklerin etki mekanizmasından sorumlu bileşenlerin tam olarak anlaşılabilmesi biyolojik aktiviteyi de açıklamaya yetersiz kalmıştır. Bu probiyotik mikroorganizmalar hedef organa ulaştığında belirli sayıda hücre içermesi gerekmektedir. Bazı probiyotik türler gastrointestinal kanaldan geçerken ince bağırsak ve kalın bağırsakta dış etkenlerden etkilenmeyip yüksek oranda yaşamsal faaliyetlerini devam ettirirken, bazıları hızlıca ortamda inhibe olmaktadır. Farklı LAB türleri arasında hem epitel yüzeye bağlanma süresi hem de yapışma gücü arasında değişkenlikler mevcuttur (Marteau, 2001). Genel olarak yeni türlerin karakterizasyonu ile spesifik probiyotik seçimi için WHO (World Health Organization- Dünya Sağlık Örgütü) tarafından da çalışmalar yürütülmektedir. Bu çalışmalarda konakçıya bağlı stres direnci, epitel yapışma kabiliyeti ve antimikrobiyal aktivite de dahil olmak üzere temel seçim kriterleri benimsenmektedir (de Melo Pereira, de Oliveira Coelho, Júnior, Thomaz-Soccol, & Soccol, 2018).

Gordon, Macbae, & Wheeler (1957) yaptıkları çalışmada laktobasillerin iyileştirici etkisinin oluşabilmesi için bağırsak ekosisteminde yaşayabilen normal kültür olmak, non-patojenik olma ve yüksek konsantrasyonda (üründe 10^7 - 10^9 kob/ml) bağırsakta kolonize olma gibi yeteneklere sahip olması gerektiğini ifade etmişlerdir. Her ne kadar da çok sayıda kriter tanımlanmış olsa da Ouwehand, Kirjavainen, Shortt, & Salminen (1999); Reid (1999) adlı bazı araştırmacılar, probiyotik suşların seçiminde insan orijinli suşların seçiminin önem arz ettiğini savunmaktadırlar. Probiyotik mikroorganizma seçiminde birçok kriterin göz önünde bulundurulması gerekmekte olup bu tür mikroorganizmaların seçimi için temel gereksinimler Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. *Probiyotik Mikroorganizmaların Arzu Edilen Özellikleri* (Lee, & Salminen, 1995)

Sağlık ve klinik özellikler	Stabilite ve teknik özellikler
İnsan orjinli	Canlılığını devam ettirdiğinin doğrulanmış olması
Safra ve aside karşı direnç	Fermantasyon sonrası aroma profili ve lezzetin gelişimi
İnsan bağırsak hücrelerine bağlılık	Depolama boyunca hafif asitliğin devamlılığı
İnsan bağırsağına kolonizasyon	İşlenme ve depolanma boyunca kolonizasyonun korunması
Antimikrobiyal maddelerin üretimi	Fermente ürünlerde stok stabilitesinin gelişimi
Karyojenik ve patojenik bakterilere karşı antagonistik etki	Dondurarak kurutma ve diğer kurutma yöntemlerinden sonra stabilite
İnsan tüketimi için güvenli	Suş tanımının doğrulanması
Klinik olarak onaylanmış sağlık etkileri	Gerekli etki oluşumu için verilen doz ve yanıt

Konakçı tarafından istenilen etkiyi gösterebilmesi için probiyotiklere ek özellik sağlamak gerekebilmektedir. Ancak potansiyel probiyotik seçiminde kriterlerin hepsini sağlamasına da ihtiyaç duyulmaması söz konusudur (Ouwehand, Kirjavainen, *vd.*, 1999). Starter mikroorganizma seçiminde güvenilir asit oluşturma kabiliyeti, en önemli seçim kriterlerinden birisi olmasına rağmen probiyotik mikroorganizma seçimindeki kriterler insan sağlığı ve refahına bağımlılık göstermektedir (German *vd.*, 1999; Oberman, & Libudzisz, 1998). Günümüz üreticilerinin ticari olarak laktik asit bakterileri ve bifidobakteri üretimi starter kültür kullanımına öncülük etmektedir (Mogensen, & Friis, 1997)

Gastrointestinal sistemde safra tuzuna karşı direnç.

Safra; safra asitleri, kolesterol, fosfolipitler ve biliveridin gibi ana bileşenlerden oluşan sarı-yeşil bir sıvıdır (Carey, & Duane, 1994; Hofmann, 1994). Safra, lipitleri çözündürerek emülsifleştiren biyolojik ajan olarak kullanılmakta ve böylece sindirime yardımcı olmaktadır. Bu çözündürme işlemi bakterinin membranı için de geçerli olduğundan dolayı güçlü bir antimikrobiyal aktiviteye de sahip olmaktadır (Begley, Hill, & Gahan, 2006). Safra bileşenleri birçok bölümden geçip kalın bağırsağa ulaşana kadar kimyasal değişime uğramakta (Demain, 1999) ve bu aşamalarda dekonjuge olmayan safra tuzları daha çok antimikrobiyal etkiye sahip olmaktadır. Ayrıca Gram pozitiflerin safra tuzu hassasiyeti, Gram negatiflerin safra tuzu hassasiyetine oranla daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Floch, Binder, Filburn, & Gershengoren, 1972; Tahri, Grill, & Schneider, 1997).

Probiyotik mikroorganizmaların hayatta kalabilmeleri için safra ve pankreatin içeren ince bağırsak sisteminin koşullarında canlılıklarını kaybetmemeleri gerekmektedir (Floch *vd.*, 1972; Huang, & Adams, 2004). Gıdaların ince bağırsağa geçiş süresi genellikle 1-4 saat arasında değişmekte ve bu esnada ince bağırsak pH'sı 8.0 civarında olmaktadır (Keele, & Neil, 1965). Safra tuzuna dirençli laktik asit bakterilerinin seçiminde bakteriler için çeşitli konsantrasyonda safra tuzu ilave edilerek selektif ortam hazırlanmakta ve sonuç olarak da büyüme düzeylerine bakılarak hayatta kalma yetenekleri test edilebilmektedir (Gilliland, Staley, & Bush, 1984). Konak hücrenin kullanımı için probiyotik bakterilerin seçiminde uygun safra tuzu konsantrasyonunun %0.15-0.30 arasında olması gerektiği tavsiye edilmektedir (Goldin, & Gorbach, 1992). Dolayısıyla probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmaların gastrointestinal şartlarda canlılığını devam ettirebilmeleri için suşların safra toleransının olması gerekmektedir (Maldonado, & Nader, 2015).

Yapılan bir çalışmada, *Lactobacillus* türlerinin kolesterolü parçaladığı ve bu durum karşında karaciğer safra tuzu üretebilmek için daha fazla serum kolesterol kullanmak zorunda kaldığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla safra tuzunun öncül maddesi olan kolesterol kullanımı artmakta buna bağlı olarak da vücuttaki serum kolesterol seviyesi azalmaktadır (Lin, Ayres, Winkler Jr, & Sandine, 1989).

Gıdalar probiyotik bakteriler için sıklıkla tercih edilen bir kaynak olarak görülmektedir. Gıdalar ve gıda ingredientlerinin gastrik ve asidik şartlarda probiyotik bakterileri koruduğu bildirilmiştir (Huang, & Adams, 2004). Charteris, Kelly, Morelli, & Collins (1998) yapmış oldukları bir çalışmada, simüle ettikleri gastrik şartlarda ortama süt proteinlerinin eklenmesi ile birlikte aside hassasiyet gösteren *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşlarının canlılıklarında artış meydana geldiğini rapor etmişlerdir.

Jacobsen *vd.*, (1999) yaptıkları çalışmada seçmiş oldukları 47 farklı *Lactobacillus* spp türlerinin probiyotik potansiyeli araştırılmış ve seçilen bu suşların %0.3 oxgall ve pH 2.5'de göstermiş oldukları dirençlilikleri incelemişlerdir. Seçilen bu suşlarda 16'sının büyümesinde 1 saatten 4 saate kadar gecikme olduğu görülmüştür. Araştırma sonunda suşlardan birisi (22571-8) hariç hepsinin safra tuzuna karşı dirençliliğinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yapılan *in vitro* deneylerde elde edilen en iyi sonuçlara göre seçilen beş suşun, (*Lb. rhamnosus* 19070-2, *Lb. reuteri* DSM 12246, *Lb. rhamnosus* LGG, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* CHCC2329 ve *Lb. casei* subsp. *alactus* CHCC313) *in vivo* denemeler için değerlendirmeye alındığı bildirilmiştir.

Gastrik asit toleransı özelliği.

Probiyotik bakteriler bağırsak sistemine ulaşmadan önce yutulduktan sonra midede salgılanan enzimlere karşı canlılığını devam ettirebilmelidir. Bu nedenle insan ince bağırsağının son kısmı olan ileumdan izole edilen *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerinin asit direnci seviyesini belirlemek amacıyla yapılan ön deneme sonunda laktobasillerin canlılığı 10^8 cfu/ml iken bifidobakterilerin ki 10^6 cfu/ml olarak değerlendirilmiştir (De Man, Rogosa, & Sharpe, 1960). Probiyotiklerin oral yolla alınımına bağlı olarak intestinal sistemde aktivite göstermeden önce mideye alınan gıdalarla gastrik asit ortamında pH'daki dalgalanmalar sıklıkla görülmektedir. Bununla birlikte midedeki pH 2.0-3.4 arasında olmakta (Dunne *vd.*, 1999) ve hatta konak hücrenin aç kalma gibi durumu söz konusu olduğunda ise pH 1.5'e kadar düşmesi de beklenmektedir (Drasar, Shiner, & McLeod, 1969). Potansiyel probiyotik seçiminde pH 2.5 olmasa da asit-tolerans özelliği olan suşların seçimi önem arz etmektedir (Pennacchia *vd.*, 2004).

Yapılan bir çalışmada bebek dışkılarından *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (6 suş), *Lb. rhamnosus* (6 suş), *Lb. acidophilus* (2 suş) *Lb. gasseri* (3 suş) ve *Lb. reuteri* (3 suş) türleri izole edilmiş olup bu türlerin gastrointestinal sistemin zorlu koşullarında aktivitelerini tespiti amaçlanmıştır. Çalışma sonunda *Lb. paracasei* ve *Lb. rhamnosus* suşlarının düşük pH'da en dayanıklı suşlar olduğunu bildirmiştir (Xanthopoulos, Litopoulou-Tzanetaki, & Tzanetakis, 2000).

Süt ürünleri ve kapsüller formda satılan probiyotikli ürünlerde en çok *Lb. acidophilus* türü kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada, American tipi kültür koleksiyonunda farklı kaynaklardan izole edilen *Lb. acidophilus* suşları satın alınmış ve 90 dk boyunca pH 3.5'te asit toleransı test edilmiştir. Çalışma sonunda bu suşların hepsinin 37 °C'de asidi tolere ettiği tespit edilmiştir (Chou, & Weimer, 1999). Başka bir çalışma da ise, süt orjinli 29 *Lactobacillus* suşlarının potansiyel probiyotikliği *in vitro* olarak çalışılmıştır. Bu çalışma kapsamında inceledikleri bakterilerin pH 1.0-3.0 arasındaki asit direnci ile %0.3 safra konsantrasyonundaki dirençliliği incelenmiştir. Yapılan *in vitro* denemenin sonunda çoğu suş pH 2.0'de safra ve pankreatin varlığından etkilenmezken, birkaç suş haricinde (*Lb. paracasei* ACA-DC 119, *Lb. paracasei* ACA-DC 3345, *L. paracasei* subsp. *tolerans* ACA-DC 4037, *Lb. plantarum* ACA-DC 146, *Lactobacillus* sp. ACA-DC 108, *Lactobacillus* sp. ACA-DC 109) tüm suşlar pH 1.0'de canlılığını sürdürememişlerdir. *In vivo* testler için en uygun *Lb. casei* shirota ACA-DC 6002, *Lb. plantarum* ACA-DC 146, *Lb. paracasei* subsp. *tolerans* ACA-DC 4037 seçilmiştir (Maragkoudakis *vd.*, 2006).

Antimikrobiyal aktivite.

Probiyotiklerin seçiminde en önemli kriterlerden bir tanesi de antimikrobiyal aktivitedir. Antimikrobiyal aktivite enterik mikroorganizmaların hedef alınma ilkesine dayanmaktadır (Klaenhammer, & Kullen, 1999). Laktik asit bakterilerinin ürettiği organik asit,(laktik, asetik, propiyonik asit), karbondioksit (CO₂), hidrojen peroksit (H₂O₂), diasetil ve düşük molekül ağırlığına sahip olan bakteriyosin gibi maddeler ile antimikrobiyal etki göstermektedir (Çakır, 2003; Ouwehand, & Vesterlund, 2004). Günümüze kadar birçok araştırmacı tarafından farklı türlerin farklı antimikrobiyal bileşen ürettiği bildirilmiştir. Bu bileşenler *Lactococcus lactis* 'in ürettiği I.sınıf (lantibiyotikler) bakteriyosin olan nisin; *Lb. reuterii*'nin ürettiği reuterin; *E. faecalis* DS16 'nın ürettiği I.sınıf bakteriyosin olan cytolysin; *Lb. plantarum* 'un ürettiği II.sınıf bakteriyosin olan plantaricin olarak belirlenmiştir (Ouwehand, & Vesterlund, 2004). Yang, & Ray (1994) yaptıkları çalışma sonucunda, bakteriyosin üretiminde laktik asit bakterilerin inkübasyon sıcaklığından, suş çeşitliliğinden büyüme ortamının kompozisyonundan ve pH gibi birçok faktörden önemli derecede etkili olduğunu tespit etmiştir.

Sanni, Onilude, Ogunbanwo, & Smith (1999) yapmış oldukları çalışmada antimikrobiyal etkinin bakteriyosin üretiminden kaynaklanan antagonistik aktivitenin tespiti araştırılmış ve çalışma kapsamında fermente tahıl ürünü olan Ogi'den (Nijerya) *Lb. plantarum* (3 suş) , *Lb. delbruckii* (1 suş), *Lb. fermentum* (1 suş), *Lb. brevis* (2 suş), *Lb. reuterii* (2 suş), *Lb. casei* (1 suş) ve *Lb. acidophilus* (1 suş) olmak üzere toplam 11 suş izole edilmiştir. İzole edilen 11 suştan 8 tanesi yapılan araştırmalar sonunda indikatör mikroorganizmalardan en az birine karşı bakteriyosinden kaynaklı inhibisyon bölgesi oluşturduğu bildirilmiştir.

Başka bir araştırmada vajinal kaynaklı laktobasillerin bakteriyosin üretimi ve karakterizasyonunun tespiti amaçlanmıştır. Jinekoloji bölümündeki 75 vajinal swap örneklerinden 100 tane laktobasil suşları izole edilmiş ve bu 100 tane *Lactobacillus* suşunda altı tanesinin bakteriyosin ürettiği tespit edilmiştir. Ayrıca insanlardaki yaygın patojenlerden olan *Gardnerella vaginalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Streptococcus milleri*, *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans* indikatör mikroorganizma olarak seçilmiştir. Bakteriyosin etki gösteren bu altı bakteri *St. milleri*, *Pr. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. cloacae* ve *G. vaginalis* mikroorganizmalarına karşı bakteriyosin etki gösterir iken *S. aureus* ve *C. albicans* mikroorganizmalarına karşı bakteriyosin etki göstermediği gözlemlenmiştir (Karaoğlu, Aydın, Kilic, & Kilic, 2003).

Hemolitik aktivite.

Hemoliz olayı patojenler arasında yaygın olan bir durum olmakla beraber temel alındığı husus konakçadaki demirin patojenler tarafından kullanılmasıdır. Bu durumun oluşmasıyla birlikte konak hücrede anemi ve ödem gibi sağlık sorunları meydana gelmektedir (Ouweland *vd.*, 2005). Eğer hemolitik reaksiyonda koloni çevresinde net bir hidroliz varsa (β hemolysis), kısmi hidroliz ile yeşilimsi bir zon varsa (α hemolysis), reaksiyon yoksa (γ hemolysis) şeklinde ifade edilir (Singh *vd.*, 2012).

Angmo, Kumari, & Bhalla (2016) Ladakh ieeği ve fermente gıdalardan izole ettiği laktik asit bakterilerinin probiyotik karakterizasyonuna yönelik çalışma yürütmüşlerdir. Bu çalışmada elde ettikleri 25 LAB'ın probiyotik potansiyelini belirlemek için *in vitro* şartlarda hemolitik aktivite analizine tabi tutmuşlar ve hemolitik aktivite için çalışılan tüm suşların negatif sonuç verdiğini tespit etmişlerdir.

Maragkoudakis *vd.* (2006) yaptıkları çalışmada süt orjinli 29 *Lactobacillus* suşlarının çoğunda (γ hemolysis) hemolitik reaksiyon göstermediğini tespit ederken, *Lb. acidophilus* ACA-DC 295, *Lb. paracasei* ACA-DC 126, *Lb. rhamnosus* ACA-DC 112 ve *Lb. sp.* ACA-DC 108 suşlarında (α hemolysis) oluşumu meydana geldiğini rapor etmişlerdir.

Başka bir araştırmada 32 bebek dışkisından (3 aylıktan daha az) *Lb. reuteri* suşları izole edilmiş ve 9 izolatan (LR5, LR6, LR9, LR11, LR19, LR20, LR25, LR26 ve LR34) hemolitik aktivitesi araştırılmıştır. Yapılan alışma sonunda, *Lb. reuteri* izolatlarının hemolitik aktivitesi olmadığı bildirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre bebek dışkisından izole edilen suşların probiyotik niteliği taşıdığını ne sürülmüştür (Singh *vd.*, 2012).

Antibiyotik direnci.

Antibiyotiklere karşı bakteriyel direnç, insanlar ve hayvanlar için ciddi tehdit oluşurmaktadır. Antibiyotik kullanımı ile direnç gelişimi arasındaki ilişki yaygın olarak çalışılan konular arasında yer almaktadır. Bu araştırmalarda antibiyotiklere karşı bakteriyel suşların dirençliliği ve direnç genlerinin onarımı gibi stratejilerin tanımlanması amaçlanmıştır (Singer, Ward, & Maldonado, 2006). Antibiyotiklerin gelişigüzel kullanımı nedeniyle insan ve hayvanlarda antibiyotik direnç geni taşıyan mikroorganizmalar, günümüzde sıkça karşılaşılan bir sorun haline gelmiştir (Robredo, Singh, Baquero, Murray, & Torres, 2000).

Antibiyotikler, dirençli olan bakterilerin gelişimini sağlarken, duyarlı olan bakterilerin gelişimini inhibe etmektedir. Antibiyotiklere karşı kazanılmış direnç, ya mutasyonlar (nokta mutasyonlarını silme, bakteri genomu içene yerleştirme vb.) ya da yatay gen aktarımı ile

oluşmaktadır. Her bir antibiyotik sınıfı için genellikle direnç kazanabileceği bir mekanizma bulunmaktadır. Bu mekanizmalar bakteri türlerine ve genetik yapısına bağlı olarak değişmektedir. Başlıca mekanizmalar: a) ilaç alımının azalması (mutasyona uğramış porinler) b) artan antibiyotik alımı c) ilaç hedefinin modifikasyonu ya da inaktivasyonu (örneğin, penisilinin ribozomal RNA da ki bağlanma proteinlerindeki mutasyonlar) d) antibiyotiğin hidrolizi (β -laktamaz) e) antibiyotik modifikasyonu (aminoglikosit modifiye edici enzimler) örnek verilebilmektedir (Normark, & Normark, 2002).

Antibiyotik direnç geni bakterilerde yapısal ya da sonradan edinilen bir özellik olmaktadır. Yapısal direnç, doğal olarak oluşan bir özellik olmakta ve bu durum bir tür özelliği olarak da sayılabilmektedir. Sonradan edinilen direnç ise genetik mutasyonlardan veya diğer bakterilerden yabancı DNA aktarımından kaynaklanmaktadır (Saarela, Mogensen, Fonden, Mättö, & Mattila-Sandholm, 2000). Edinilmiş antibiyotik dirençlilik geni canlı türlerin habitatlarında (örneğin insan ve hayvanların bağırsaklarında) bulunabilmektedir. Üretim sırasında yanlışlıkla dışkı ile kontamine olmuş hayvansal (et ve süt) ürünlere doğrudan bulaşabilmekte ve nihai olarak da hammaddesi bu ürünler olan fermente gıdalardan da tüketiciye antibiyotik direnç geni aktarılmaktadır. Fermantasyonda başlıca rol alan laktik asit bakterilerinin gıdalardan edinmiş oldukları antibiyotik direnci özelliği seçilmiş markerler sayesinde genetik modifikasyonlara (örneğin; metabolik özelliklerine göre gıdaya uyumlu vektör) uğratılabilmektedir (Teuber, Meile, & Schwarz, 1999). Probiyotik niteliği taşıyan LAB'ın yeteri kadar tüketimi sağlandığında bağırsak mikrobiyal dengesini sağlamada ve eski formuna getirebilmesinde büyük önem arz etmektedir. Oluşturdukları bu yarardan dolayı zarar veren popülasyonun oluşturduğu etkileri ortadan kaldırabilmektedir (Ouweland, Salminen, & Isolauri, 2002). Bununla birlikte patojenik mikroorganizmalara antibiyotik direnç genlerini transfer etme potansiyelleri unutulmamalıdır. Bilhassa bazı antibiyotik direnç genleri, özellikle de plazmidler tarafından kodlananlar mikroorganizmalar arasında transfer edilebilmektedir. Bu özellik direnç genlerinin probiyotikler tarafından endojen floraya mı yoksa patojenlere mi aktarabildiği sorusunu gündeme getirmektedir (McConnell, Mercer, & Tannock, 1991).

Son zamanlarda LAB fizyolojisi ve genetiği üzerine ilgi büyük ölçüde artmakta ve fermantatif süreçlerde starter kültür kullanımıyla birlikte probiyotik mikroorganizmaların kullanımında gün geçtikçe artacağı düşünülmektedir. Dolayısıyla bu ve diğer uygulamalarda kullanılacak probiyotik mikroorganizmaların güvenlik yönleri açısından potansiyel transfer edilebilir antibiyotik dirençlilik geni endişe verici olmaktadır (Ammor, Flórez, & Mayo, 2007). Bazı uygulamalar için seçilmiş LAB'ın antibiyotiklere karşı direnç göstermesi onların bu özelliğinin doğal özelliği olması ve diğer canlılara bu özelliği aktarmaması anlamına da

gelmektedir. Ancak LAB'ın bazı türlerinde plazmitlerde kodlanmış ve canlılara aktarılabilen direnç genlerinin tespiti de yapılmıştır (Ouoba, Lei, & Jensen, 2008; Zhou, Pillidge, Gopal, & Gill, 2005).

Potansiyel probiyotik *Lactobacillus* türlerin seçimi ile birlikte ticari olarak satışa sunulan suşlarda *in vivo* şartlardaki istenmeyen bir durum olan antibiyotik direnç gen aktarımı ile ilgili güvenliğin oluşumu sağlanmaktadır (Adams, & Marteau, 1995; Charteris, & Kelly, 1993; Charteris, & Morelli, 1994).

Charteris, Kelly, Morelli, & Collins (1998) insan ve süt orjinli 46 *Lactobacillus* suşunun antibiyotik hassasiyeti üzerine yaptığı çalışmada, tüm suşların hücre duvarı sentezi inhibitörleri olan cefoxitin (30 µg) ve aztreonam (30 µg), protein sentezi inhibitörü olan amikacin (30 µg), gentamicin (10 µg), kanamycin (30 µg) ve streptomycin (30 µg), nükleik asit sentezi inhibitörü olan norfloxacin (10µg), nalidixicasit(30µg), sulfametoksazol (100 µg), trimetoprim (5 µg), ko-trimoksazol (25 µg) ve metronidazol (5 µg) ve son olarak ta sitoplazmik membran fonksiyonu üzerine inhibitör etki gösteren polimiksin (300 µg) olmak üzere toplam 14 farklı antibiyotiğe karşı dirençli olduğunu tespit etmiştir. Hassasiyeti ise tetrasiklin (30 µg), kloramfenikol (30 µg), rifampisin (30 µg) antibiyotiklerine karşı gösterildiği bildirilmiştir.

Antifungal aktivite.

Dünyanın en önemli temel gıdalarından birisi olan ekmek birçok küf tarafından bozulabilmektedir. Özellikle de *Penicillium* türleri yaygın olarak maruz kalınan küf türü arasında yer almaktadır. Ancak bu bozulma türleri ekmeğin florası ve saklama koşullarına göre değişmektedir. Hem halk sağlığı için hem de ekonomik kayıpları minimize edebilmek için endüstride fungostatik etki gösteren maddeler kullanılmaktadır (Legan, 1993). *Aspergillus niger*, *Penicillium corylophilum*, *Penicillium roqueforti*, *Endomyces fibuliger*, *Aspergillus flavus*, *Monilia sitophila*, *Fusarium graminearum* küf türleri kontamine fırın ürünlerinden izole edilen küflerini temsil etmektedir (Legan, 1993). Yapılan bir çalışmada, meyve, sebze ve süt ürünlerinden izole edilen Laktik asit bakterilerinin antifungal ve antimikotoksijenik aktivitesi taranmış ve test edilen 420 izolattan dördü *Penicillium* (4 tür) türünde inhibitör etki göstermiştir. Belirlenen türlerden ikisinin *Penicillium citrunum* ve *Penicillium expansum* türüne karşı etki spektrumunun etkisinin diğer türlere göre fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu iki izolat ise *Lb. casei* olarak tanımlanmıştır ve bu iki Laktobasil türünün inhibitör aktivitesinin ürettiği hidrojen peroksit (H₂O₂) ya da laktik asitten kaynaklandığı öne sürülmüştür (Gourama, 1997).

Penicillium türleri süt ürünleri olarak üretimi yapılan peynirlerin olgunlaşması ve depolanması sırasında yaygın kontaminantlar olarak bilinmekte iken bazı araştırmacılar peynirde sorun oluşturan türler arasında *Penicillium* spp. yanı sıra *Aspergillus* türleri de baskın kontaminantlar arasında yer alabileceğini öne sürmüşlerdir (Scott, 1990). Peynirden izole edilen *Penicillium* türlerinin çeşitli mikotoksinler ürettiği bilinmektedir. Ayrıca mikotoksijenik türlere ek olarak peynirden izole edilen fungal türlere *Cladosporium*, *Alternata*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Candidum* ve *Mucor* örnek verilebilmektedir (Scott, 1990).

Yapılan birçok çalışmada LAB'ın antimikrobiyal etkisinden bahsedilirken (Dodd, & Gasson, 1994), antifungal bileşenlerle ilgili de çok veri bulunmamaktadır. İlk zamanlarda yapılan araştırmalarda *Aspergillus parasitus*'un hem büyümesini hem de aflatoksin üretimini inhibe eden *Lb. casei* suşunda antifungal aktivite tespit edilmiştir (El-Gendy, & Marth, 1981). Yapılan bir çalışmada ise karışım haline getirilen *Lactobacillus* spp. nin küf oluşumunu ve spor çimlenmesinin engellediği ve ayrıca *A. flavus* subsp. *parasiticus*'un aflatoksin üretiminin azaltılması gibi durumlarda etkin rol oynadığı bildirilmiştir (Gourama, & Bullerman, 1995). Benzer olarak yürütülen başka bir çalışmada ekşi hamurdan izole edilen laktik asit bakterilerinin çimlenme yöntemi ile antifungal aktivitesi test edilmiş ve buğday unu hidrolizatı içinde yetiştirilen *Lb. plantarum* 21B suşunun 10 kat konsantre edilmiş kültür süzüntüsünün *Eurotium repens* IBT18000, *Eurotium rubrum* FTDC3228, *Penicillium corylophilum* IBT6978, *P. roqueforti* IBT18687, *P. expansum* IDM/FS2, *Endomyces fibuliger* IBT605 ve IDM3812, *A. niger* FTDC3227 ve IDM1, *A. flavus* FTDC3226, *Monilia sitophila* IDM/FS5 ve *Fusarium graminearum* IDM623 türlerine karşı neredeyse tamamen etkili olup inhibe ettiği bulunmuştur (Lavermicocca vd., 2000).

Tutunma özelliği.

Mukozal yüzeylere probiyotiklerin yapışması ve kolonizasyonu patojenlere karşı bağlanma bölgelerinde ve besin maddeleriyle olası rekabetlerden korunma mekanizması olarak tarif edilebilmektedir (Collado, Gueimonde, Hernandez, Sanz, & Salminen, 2005; Ouwehand vd., 2002). Kolonizasyon aşaması için yapışma ön koşul olarak değerlendirilmektedir (Beachey, 1981). Kesin olmamakla birlikte, yapılan çalışmalar *in vivo* kolonizasyonla *in vitro* adhezyon arasında bağlantı olduğu bildirilmiştir (Cesena vd., 2001; Crociani, Grill, Huppert, & Ballongue, 1995).

LAB, Gram negatif ve Gram pozitiflere karşı çeşitli metabolitler üreterek bu tür mikroorganizmaların büyümelerini inhibe edebilmektedirler. Bu inhibasyon, asetik asit ve laktik asit gibi organik asitler (Gilliland, & Speck, 1977), hidrojen peroksit, bakteriyosin,

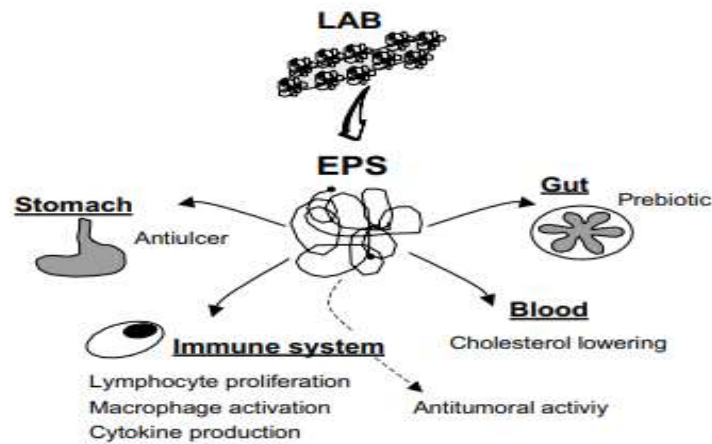
bakteriyosin benzeri bileşenler ve biyosümfaktanlar vasıtasıyla gerçekleşmektedir (Velraeds, Van der Mei, Reid, & Busscher, 1996). Diğer yandan bazı çalışmalarda adhesiv *Lactobacillus* türlerinin patojenlerin bağırsak sistemine yapışmasını engelleyerek enfeksiyon oluşumunun önüne geçildiği bildirilmiştir (Lee vd., 2000). Belirtilen antagonistik özellik probiyotik ürünler içinde kullanılmaktadır (Lee, & Salminen, 1995). Potansiyel probiyotiklerin epitel yüzeye yapışabilmesi için gastrik şartlarda canlılığını kaybetmemeli, bağırsak sistemindeki peristaltik hareketten etkilenmeyerek geçici olarak da olsa bağırsak mukozasına tutunabilmelidir (Lee, & Salminen, 1995). Kültürün hücre yüzeyine yapışabilmesi içinde hidrofobisite özelliğine sahip olması gerekmektedir. İntestinal sistemde konakçı ile patojenik mikroorganizmaların birleştiği nokta da mukus tabakası bulunmaktadır. Son zamanlarda probiyotik mikroorganizmaların yapışma potansiyelinin araştırılmasında insan dışkılarından ekstrakte edilen glikoproteinleri ile insan ileostomi glikoproteinleri bağırsak mukozası için model olarak kullanılmaktadır (Kirjavainen, Ouwehand, Isolauri, & Salminen, 1998; Ouwehand, Isolauri, Kirjavainen, & Salminen, 1999; Tuomola, Ouwehand, & Salminen, 1999).

Probiyotiklerin antikanserojenitesi Burns, & Rowland (2000), tarafından kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Genel olarak probiyotik takviyelerinin kolon mukozasındaki DNA hasarı, hayvan modellemelerindeki tümör oranı, bakteriyel enzim aktivitelerinin değiştirilmesi gibi durumlarda koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir. Böylece kanser oluşumunda rol oynayan enzim seviyelerinin düşürülmesine yardımcı olmaktadır (Cole, Fuller, & Carter, 1989; Tokunaga, Oku, & Hosoya, 1986). Bu çalışmaların bazılarında uygulanan probiyotikler ile prebiyotiklerin kombinasyonlarının kolon lezyonu üzerinde sinerjistik etki göstermeleri dikkat çekici olmaktadır (Abdelali vd., 1995). Hayvan modellemeleri kullanılarak potansiyel antikanser özellikleri olan probiyotik ve prebiyotik kombinasyonunun belirlenmesi zaman alıcı ve pahalı olmaktadır. Başlangıçtaki DNA hasarı ve kolon kanserinin ilerlemesi hayati önem taşıdığı göz önüne alındığında *in vitro* yöntemlerin daha pratik ve alternatif bir olanak sağlaması açısından daha çok tercih edilmektedir (Fearon, & Vogelstein, 1990). DNA hasarı üzerine yapılan bir çalışmada laktik asit üreten 6 tane (*Bifidobacterium* sp. 420, *Bifidobacterium* Bb12, *Lb. plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* ve *E. faecium*) bakteri suşu genotoksik fekal su ile inkübe (1×10^8 cfu/ml) edildikten sonra HT-29 adenokarsinoma hücreleri ile muamele edilerek DNA hasarı üzerinde oluşturduğu etki tek hücreli jel elektroforez yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. DNA hasarı *S. thermophilus* hariç kullanılan bütün bakteriler tarafından önemli oranda azaltıldığı tespit edilmiş özellikle de *Bifidobacterium* Bb12, *Lb. plantarum* suşları DNA hasarına karşı en büyük etkiyi gösterdiği rapor edilmiştir (Burns, & Rowland, 2004).

Ekzopolisakkarit (EPS) Üretim Özelliği

LAB, farklı çeşitlilikte ekzopolisakkarit (EPS) üretme kabiliyetine sahip mikroorganizmalardır. Bu EPS' ler yapısal bileşimlerine göre homopolisakkarit ve heteropolisakkarit olarak sınıflandırılmaktadır. Tekstürel ajan olarak kullanımları ile dikkat çekmekte ve birçok fermente gıda ürünlerinde doğal olarak sentezlenmektedirler. GRAS ve probiyotik statüsüne sahip laktobasillerde EPS üreten türler tercih edilmektedir. Ancak sağlık iddialarının tam olarak doğrulanmaması ve endüstriyel üretimde düşük verimli olmaları nedeniyle dezavantaj olarak görülmektedir (Badel, Bernardi, & Michaud, 2011). Ancak EPS'in fizyolojik olarak fagozitoza karşı biyolojik savunma sistemlerinin ilk hattı olduğu ve faj atakları gibi durumlardan koruduğunu belirtmekte ayrıca yüzeysel adezyonda da önemli bir fonksiyon icra ettiği bilinmektedir (Fukuda *vd.*, 2010).

20. yy. başlarında bazı laktik asit bakterilerinin insan sağlığı üzerine yararlı etkilerinden bahsedilmiştir. Probiyotik bakteriler içeren fonksiyonel gıdaların geliştirilmesiyle birlikte hem sağlık hem de ekonomik yarar nedeniyle gıda pazarında yerini almıştır (Salminen *vd.*, 1998). Probiyotik olarak kullanılan bakteriler ağırlıklı olarak laktobasiller ve bifidobakteriler olmakta ve bu bakterilerin bazılarının EPS üretim yeteneği olduğu bildirilmektedir. Aslında EPS üreten suşlarının sağlığı teşvik etmelerinin temel sebebi bu polimerlerin biyolojik aktivitelerinden kaynaklandığı bilinmektedir. Ekzopolisakkaritler prebiyotik, immünomüdülatör, antiülser gibi aktivite göstererek konak hücrenin sağlığına katkıda bulunabilmektedir (Şekil 5). Nitekim fermente süt ürünlerinin insan sağlığındaki rolünün LAB türlerinin ürettiği EPS'den kaynaklı olabileceği düşünülmektedir (Kitazawa *vd.*, 1998).



Şekil 5. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritlerin sağlığı teşvik etmeleri ile ilgili olası şematik gösterimi (Ruas-Madiedo, Hugenholtz, & Zoon, 2002).

Ayrıca EPS konak hücre ekosisteminde biyofilm oluşumunda da aktif rol oynamaktadır. LAB tarafından üretilen EPS fonksiyonu karmaşık bir yapıya sahip olmasından dolayı netlik kazanmamıştır. Ancak işlevselliğin suş bazında farklılık göstermesi ve hücrenin farklı ortamda oluşturduğu tepki ile alakalı olduğu düşünülmektedir (Ruas-Madiedo *vd.*, 2002). Bununla ilgili Yasuda, Serata, & Sako (2008) yaptıkları bir çalışmada yüksek molekül ağırlıklı EPS üreten probiyotik suş olan *Lactobacillus casei shirota* ile EPS üretimi bakımından düşük aktivite gösteren mutant suşlarının fare makrofağ hücrelerindeki sitokin üretimleri açısından değerlendirmesi yapılmıştır. Ortama eş zamanlı olarak *E. coli* hücreleri ilave edildiğinde *Lb. shirota*, lipopolisakkaritlere bağlı IL-6 sitokininin üretimini azaltırken mutant suşların bu durumun aksine katkıda bulunduğunu tespit etmişlerdir.

LAB tarafından üretilen EPS' ler yapısal çeşitlilik göstermektedir. Bu nedenle istenilen özelliklere sahip polisakkaritlerin tasarımı için EPS biyosentezinin tespiti önem arz etmektedir (Jolly, & Stingle, 2001). LAB'lar genel olarak homopolimerik ve heteropolimerik EPS üretme yeteneğine sahip mikroorganizmalardır. LAB türleri tarafından üretilen homopolimerik EPS'de tek bir gen sorumlu iken heteropolimerik EPS üretiminden spesifik gen (eps cluster) kümesi sorumludur. Homopolimerik EPS üretimi için literatürde genellikle glukoz ve fruktan tipi polisakkaritlerin varlığı ön plana çıkmakta ve bu polimerlerin üretiminden sorumlu kodlayıcı genler sırasıyla glikoziltransferaz ve fruktoziltransferaz olmaktadır. Heteropolisakkarit EPS ise daha kompleks bir yapıya sahiptir ve yaklaşık olarak 14-20 genin bir arada bulunduğu EPS gen kümesi sorumludur (İspirli, 2016).

Birçok laktobasil suşu sükrözden glukoz ve fruktan üretebilme kabiliyetine sahiptirler. Tiekling *vd.* (2005) göre, bağırsak florasında büyük oranda ortamda laktobasillerin hakim olması ile birlikte sükrözden polisakkarit üretiminin gerçekleşmesi kaçınılmazdır. Oluşan bu polisakkaritlerin ise genellikle glukoz ve fruktoz oligosakkaritlerinin oluşumuyla ilişkili olduğunu savunmuşlardır. EPS üreten suşların çoğu intestinal şartlarda hayatta kalabilmekte hatta bağırsak epiteline kolonize olabilmektedir. Bu bileşikler immün sistemi sitümlü etmede ve patojenler ile rekabet içerisinde olup mukozaya yapışmada yardımcı olmaktadır. Bu konuyla ilgili yapılan bir çalışma da *Lb. reuteri*'de *gtf* geninin silinmesiyle birlikte glukoz üretmemesinin mukozal kolonizasyonu olumsuz yönde etkilediği görülürken, *fff* geninin silinmesi ile değişiklik meydana gelmediği bildirilmiştir (Walter, Schwab, Loach, Gänzle, & Tannock, 2008). Yine benzer bir çalışma da insan florası ile kolonize edilen fareler %5 oranında inülin-oligofruktoz karışımı ile beslendikten sonra kolon sisteminde morfolojik (goblet hücreleri ve villusların derinliklerinde artış) değişikliklere sebep olduğunu rapor etmişlerdir (Kleessen, Hartmann, & Blaut, 2003).

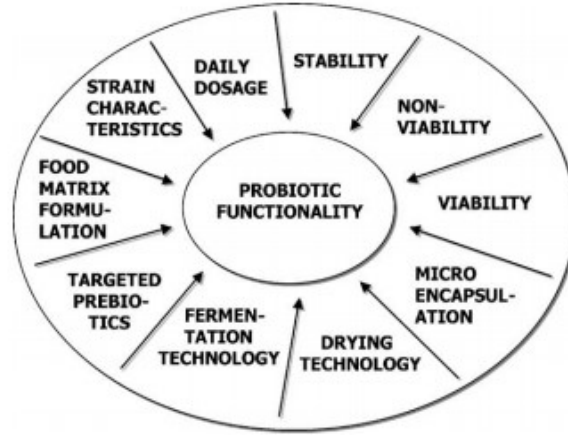
Probiyotiklerin Fonksiyonel Yönleri

Probiyotik özellik gösteren farklı mikroorganizmalar ticari olarak başlıca fermente gıdalarda takviye olarak ya da liyofilize forma dönüştürülerek satışa sunumu gerçekleştirilmektedir. Özellikle de bakteriyel suşlar arasında *Lb. shirota* ve *Lb. acidophus* ' un suşları sağlık üzerine yararlı etkileri uzun yıllardır bilinmektedir. Günümüzde ticari olarak kullanılan probiyotik ürünlerde *Lactobacillus* türlerinin kullanımı yaygınlık göstermektedir (Holzapfel vd., 1998). Fakat aynı tür bile olsa farklı suşların bireylerde farklı semptomlar göstermesi ve bu sebeple detaylı klinik çalışmalara gereksinim olması nedeniyle yüksek maliyet gerektirmektedir (Klaenhammer, 2000). Probiyotik olarak kullanılan bakteriler için yararlı etkiler Tablo 4'de verilmiştir (Holzapfel vd., 1998). Probiyotik suşlar geçici olarak gastrointestinal sisteme kolonize olmakta ve böylece IgA seviyesinde artışa sebep olmaktadır (Schiffirin, Rochat, Link-Amster, Aeschlimann, & Donnet-Hughes, 1995; Tanaka, 1996). Fonksiyonellik kazandırılan probiyotikli ürünlere katılan probiyotik suşlar genellikle yetişkin insanın gastrointestinal sisteminden izole edilmiştir.

Tablo 4. *Probiyotik Mikroorganizmaların İnsan Vücutunda ki Etkileri* (Holzapfel, & Schillinger, 2002)

Besleyici etkileri	Vitamin üretimi, mineral ve iz miktarda elementlerin varlığı Önemli sindirim enzimlerin üretimi
Engelleyici etkisi	Seyahat diyaresi, antibiyotik kullanımına bağlı ishal Kolesterol düşürücü etkisi İmmün sistemin stümülasyonu Bağırsak hareketliliğinin artmasıyla kabızlıktan kurtulma Mukozal bütünlüğün korunması Kolonizasyon direnci ve yapışma

Probiyotik mikroorganizmaların bazı teknolojik ve fizyolojik karakteristikleri uzun zaman önce tanımlanmıştır (Vasiljevic, & Shah, 2008). Optimum fonksiyonellik için probiyotiklerin en iyi aktivite ve canlılıkları ön koşul olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte bazı çalışmalarda canlı olmayan probiyotiklerin konakçı üzerinde kanserojen maddelere bağlandığı ve immün sistemi modüle etmesiyle yararlı etkiler gösterdiğini bildirmiştir (Ouweland, & Salminen, 1998; Salminen, Ouweland, Benno, & Lee, 1999). Nitekim belirlenmiş probiyotik suşların üründe yeterince yüksek oranda hücre elde etmek için başlangıç üretim koşullarında iyi gelişmesi yeterli olacaktır. Probiyotiğin fonksiyonelliğini etkileyen teknolojik faktörler Şekil 6'da gösterilmiştir.



Şekil 6. Probiyotiklerin fonksiyonelliğini etkileyen teknolojik faktörler (Mattila-Sandholm vd., 2002).

Probiyotiklerin İnsan Sağlığı Üzerindeki Rolü

Fermente gıdaların ve probiyotiklerin sağlık yararları üzerine birçok çalışma yapılmasına rağmen yeteri kadar analiz ve mikroorganizma kullanılmaması bu etkinin tam olarak açıklanamamasına yol açmaktadır. Dolayısıyla elde edilen bir takım sonuçlar kesinliği ifade etmeyip tahmini sonuçları göstermektedir (Çakır, 2003). Probiyotikler, enfeksiyonların önlenmesi veya durdurulması gibi her iki faktörün azaltılmasında ümit verici rol üstlendiği görülmektedir. Bir takım hastalıklarda probiyotik kullanımının güvenliği ve etkinliğinin değerlendirilmesi ile ilgili klinik denemeler halen yürütülmektedir (Gogineni, Morrow, Gregory, & Malesker, 2013).

Laktoz intoleransının hafifletilmesi.

Laktoz intoleransı, intestinal mukozal enzim olan β -galaktozidaz (laktaz; EC 3.2.1.23) enziminin doğuştan gelen eksikliğine ya da zamanla oluşan gastroenterisit gibi bağırsak bozukluklarından dolayı laktaz aktivitesindeki azalışa bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (Hughes, & Hoover, 1991). Bu rahatsızlığı olan bireyler, fermente süt ürünlerinin tüketiminden sonra sindirilemeyen laktozun kolon bakterileri tarafından sindirildikten sonra şişkinlik, ağrı, diyare gibi sağlık problemleriyle karşılaşmaktadırlar. İntolerans semptonlarından dolayı bu kişiler süt ve süt ürünlerinin tüketiminden uzak dururlar. Bu nedenle düşük seviyelerde kalsiyum tüketimi yapabilirler. Bu durumla ilgili yapılan çalışmalarda laktoz intoleranslı bireylerin yoğurt gibi fermente süt ürünlerinin tüketiminde sindirimin doha kolay olduğu bildirilmiştir. Bu gelişme fermente üründe bulunan starter bakteriler tarafından laktozun kısmi hidrolazının gerçekleştiği hususuna işaret etmektedir (O'sullivan, Thornton, O'sullivan, & Collins, 1992).

İmmün sistemin kuvvetlendirilmesi.

Etki mekanizması tam olarak anlaşılmasına rağmen immün sistem üzerinde umut verici bir etki olarak görülmektedir. Konakçının immün sisteminde probiyotik bakterilerin pozitif etki gösterebileceğiyle ilgili çalışmalar yürütülmüştür (Mombelli, & Gismondo, 2000) . Bu konuyla ilgili birçok çalışma yapılmakla beraber birçok araştırmacı probiyotiklerin immün sistem üzerinde stimüle edici etkisinin olduğunu ortaya koymuştur. Fareler ve insanlar üzerinde bir takım *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar yapan Dugas *vd.* (1999); Scheinbach (1998) oral bakteriyoterapi ve fermente süt ürünlerinde yaşayan canlı mikroorganizmaların bazı patojenlere karşı immün sistemi desteklediğine dair bulgular elde etmişlerdir. Probiyotiklerin immün sistemi geliştirmesine yönelik oluşturduğu etkiler şu şekilde sıralanabilir ; sitokin üretimi , makrofajların stimülasyonu ve IgA konsantrasyonundaki artışla beraber immün sistemin güçlendirilmesidir (Çakır, 2003; Dugas *vd.*, 1999; Scheinbach, 1998).

Guarner *vd.* (2005) yaptıkları bir çalışmada fareleri yoğurt kültürleriyle beslemişler ve bu beslenmeye bağlı olarak makrofajların gelişimini uyarıldığını ve IgA konsantrasyonunda artış olduğunu tespit etmişlerdir. Farklı bir çalışma da ise , 24 kişiyi 4 ay boyunca her gün 450 gr yoğurt ile beslenmiş ve 4 ay sonunda bu kişilerde önemli oranda γ -interferon üretiminde artış olduğu gözlemlenmiştir (Halpern, Vruwink, Van de Water, Keen, & Gershwin, 1991). Bu çalışmalardan da anlaşılacağı üzere Laktobasillerin probiyotik etki göstermesi olası olmakla beraber insan immün sistemini modüle ederek konakçının sağlığını olumlu yönde etkilediği anlaşılmaktadır.

Hayvan modellerinde, probiyotiklerin antikorların (lokal ve sistemik) üretimini uyarması, makrofajların aktivitesini artırması ve γ -interferon seviyelerindeki artış olduğu elde edilen bulgular arasında yer almaktadır. Dolayısıyla probiyotik kültürün nan-patojenik olması kritik önem taşımaktadır (Fooks, Fuller, & Gibson, 1999).

Diyare oluşumunun azaltılması.

LAB'ın kolondaki gelişimiyle birlikte laktik ve asetik asit üretmekte ve buna bağlı olarakta düşük bir pH ortamı oluşturmaktadır. Bu sayede Gram-negatif fakültatif anaerobların gelişimi engellenerek ishal oluşumuna karşı koruyucu etki göstermektedir (Scheinbach, 1998). Diyare oluşumunun bir çok sebebi olduğundan dolayı probiyotiklerin etkilerinin net bir şekilde anlaşılması oldukça zor olmaktadır. Fakat probiyotiklerle ilgili bir çok çalışma yapılmış ve çalışmalar doğrultusunda probiyotiklerin diyare üzerinde olumlu etkisi olduğu kanıtlanmıştır. İshal oluşumuna bağlı olarak yaygın olarak çocuk ölümleri meydana gelmektedir. Bu durumun ortak bir sebebi ise rotavirüsten kaynaklı olmasıdır (Scheinbach, 1998). Yeni doğan bebeklerin

gastrointestinal sistemi annenin vajinal ve fekal florası ile aşlanmaktadır (Mevissen-Verhage, Marcelis, De Vos, Harmsen-van Amerongen, & Verhoef, 1987). Saavedra, Bauman, Perman, Yolken, & Oung (1994) yapmış olduğu çift körlü ve plasebo kontrollü çalışmada, hastane de yatmakta olan 5-24 aylık 55 çocuğun *B. bifidum* (1.9×10^8 cfu/g toz bebek formülü) ve *S. thermophilus* (0.14×10^8 cfu/g toz bebek formülü) formülasyonlarıyla beslenmesi ile akut diyare ataklarının önleneceğini öne sürmüştür. Benzer başka bir çalışmada ise *Lb. GG* 'nin akut diyare vakalarındaki etkisi incelenmiştir. Çalışma kapsamında iki grup değerlendirilmiş ve I. çocuk plasebo grubunu (140 çocuk) ifade ederken II. LGG grubunu (147 çocuk) ifade etmektedir. Yürütülen çalışma sonunda LGG verilen rotavirüs diyareli çocukların defekasyon sürelerinde azalma olduğu tespit edilmiştir (Guandalini *vd.*, 2000).

Serum kolesterol seviyesinin düşürülmesi.

Harrison, & Peat (1975) *Lb. acidophilus* ile formüle edilmiş gıda ile beslenen bebeklerle *Lb. acidophilus* içermeyen gıda ile beslenen bebeklerin kolesterol seviyelerinin değerlendirmesini yapmış ve araştırma sonucunda *Lb. acidophilus* formülasyonlu gıda tüketen bebeklerin diğer gruba göre kolesterol seviyesinin daha düşük olduğunu rapor etmişlerdir. Elde edilen bu bulgular probiyotik suşların hücre sel zarlarında kolesterolü asimile edebildiğini gösteren Pereira, & Gibson (2002b) tarafından yapılan araştırmalarla desteklenmiştir. Bununla birlikte kolesterolü asimile etme yeteneği suşlar arasında değişkenlik göstermekte ve safra toleransı yüksek olan suşların kolesterolü asimile etme zorunluluğu bulunmamaktadır. Bu konuyla ilgili yapılan çalışmada Dambekodi, & Gilliland (1998) II suşun S9 suşundan daha az safrayı tolere edebilmesine rağmen kolesterol asimilasyonunun S9 suşundan daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Tahri, Crociani, Ballongue, & Schneider (1995) tarafından resting hücreleri ile yürütülen çalışmada, bu hücrelerin kolesterol ile herhangi bir interaksiyona girmediği öne sürülmüştür. Yapılan başka bir çalışmada ise, yüksek miktarda kolesterolle beslenen domuzlar ile laboratuvar ortamında safra dirençli ve kolesterolü asimile eden *Lb. acidophilus* suşu ilave edilmiş diyetler ile beslenen domuzların kolesterol miktarları kıyaslanmıştır. Çalışma sonunda ise *Lb. acidophilus* suşu ile takviye edilmiş diyetleri alan grubun kolesterol konsantrasyonunda anlamlı bir düşüş olduğu görülmüştür. LAB'lar safra asitleri aracılığıyla da uygulayabilmektedirler. Hepatositler tarafından kolesterolden üretilen safra asitleri (kolik ve deoksikolik asit) sırasıyla glisin ve taurin ile konjuge edilir. Fermente gıdalarda konjuge safra asitlerinin hidrolizini sağlayan *Bacteriodes* türleri, laktobasiller, bifidobakteriler, fusobakteriler bulunmaktadır (Hentges, 2012). Hayvan ve insan denemelerinde elde edilen kapsamlı çalışmalara bakılarak probiyotik bakteri içeren fermente

ürünlerin tüketimi sonucunda orta düzeyde kolesterol düşürücü etkisinin olduğu saptanmıştır (St-Onge, Farnworth, & Jones, 2000).

Antikanserojen etki.

Probiyotik mikroorganizmaların antikanserojen etkisiyle ilgili birçok *in vivo* ve *in vitro* denemeler yapılmıştır. Derleme amacıyla yapılan tıbbi literatür taranmasında (1996-2004) denek olarak kullanılan 12 hayvan çalışmasında sadece 2 probiyotiğin antikanserojen etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Commane, Hughes, Shortt, & Rowland, 2005).

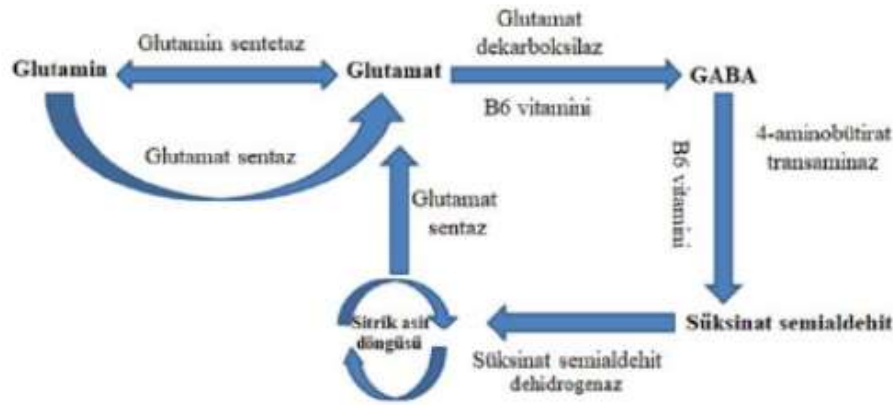
Yapılan epidemiyolojik çalışmalar Batı dünyasındaki kolon kanseri oranının artmasındaki temel sebebi yüksek yağlı diyetle ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu durum için kolon içerisinde bulunan bağırsak bakterileri, safra asitleri ve kolesterol metabolitlerinin karsinogenez aktivitelerindeki değişikliklerden kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Reddy, Watanabe, Weisburger, & Wynder, 1977). Mikroflorada kendiliğinden oluşan fekal bakteriyel enzimler (β -glukuronidaz, nitroredüktaz ve azoredüktaz) prokarsinojenleri karsinojenlere çevirerek kanser oluşumunda önemli rol oynamaktadırlar. Bu durumun önüne geçerek kolon kanseri riskini azaltabilmesi adına probiyotiklerle ilgili yoğun çalışmalar sürdürülmektedir (Scheinbach, 1998). Bakteriyel enzim β -glukuronidaz geniş substrat spesifitesi nedeniyle birçok glukronidi hidrolize etme yeteneğine sahip olduğundan dolayı bağırsak lümenindeki kanserojenik aglikonları serbest bırakabilmektedir. Yapılan bir takım çalışmalarda kemirgenlerin diyetlerinde laktik asit bakterisi takviye edildiğinde fekal bakteriyel enzimlerin aktivitelerini önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (Abdelali *vd.*, 1995; Kulkarni, & Reddy, 1994).

Gamma-Aminobütirik Asit (GABA) Üretimi

Gamma-aminobütirik asit (GABA) ilk defa 1950 yılında nöral kontrol teorisi ile keşfedilmiştir. Ana uyarıcısı olarak glutamat kullanılmakta ve memeli korteksinde ana inhibitör nörotransmitterdir (Petroff, 2002). γ -Aminobütirik asit (GABA) bakterilerden bitkilere kadar yaygın olarak bulunan dört karbonlu bir amino asittir. Omurgalılar için GABA büyük bir inhibitör nörotransmitter olarak bilinmekte ve farelerde de kan basıncını düşürme gibi özellik göstermektedir (Abe *vd.*, 1995). Çok sayıda hayvan çalışmasına kıyasla son zamanlarda GABA kullanımını ele alan klinik çalışmalar yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada hafif hipertansiyonu olan hastalarda fermente süt ürününün içerisinde bulunan GABA'nın kan basıncı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Çalışma kapsamında 39 hipertansif hastaya (16 kadın-23 erkek) plasebo kontrollü olmak üzere 12 hafta boyunca günlük olarak 100 ml fermente süt ürünü (GABA)

belirli periyotlarla verilerek kan basıncı ölçülmüş ve hipertansif hastaların kan basıncını önemli ölçüde düşürdüğü tespit edilmiştir (Inoue *vd.*, 2003).

GAD enzimi, omurgalı hayvanların merkezi sinir sisteminde önemli role sahiptir ve burada ana inhibitör nörotransmitter olan GABA'nın sentezinden sorumludur. GABA aracılı sinyallerin düzenlenmesi birkaç mekanizma içermektedir. Bunlar arasında hız sınırlayıcı enzim glutamat dekarboksilaz (GAD), γ -Aminobütirik asit (GABA) sentezinin modülasyonundan anahtar rol oynamaktadır. Moleküler klonlama çalışmaları yetişkin beyninde GAD'ın iki tane izoformu olduğunu tespit etmiştir. Bunlar insanlarda 2 ve 10 kromozomlarında bulunan bağımsız olarak düzenlenmiş GAD65 VE GAD67 adı verilen gen ürünleridir (Soghomonian, & Martin, 1998). Anatomik çalışmalar iki GAD geninin merkezi sinir sisteminin nöronlarını içeren GABA'nın çoğunda eksprese edildiğini göstermiştir (Esclapez, Tillakaratne, Kaufman, Tobin, & Houser, 1994; Feldblum, Erlander, & Tobin, 1993). GABA sentezi beyin küçük bir kısmında oluşmakta bu da GAD'ın maksimum katalitik kapasitesinin küçük bir kısmında çalıştığını göstermektedir. Beyinde bulunan glutamik asit GAD enzimi aracılığıyla GABA'ya dönüşüm gerçekleşmektedir. Fazlalığında ise GABA, GAD gibi piridoksal-5'- fosfata bağlı gamma-aminobütirat transminaz enzimi tarafından indirgenmektedir (Yalçınkaya, Kılıç, & Çakmakçı, 2019)(Şekil 7). Böylece beyin yeni GABA sentezi için gerekenden daha fazla GAD içermekte ve GABA'ya gereksinim duyulduğu durumda depolama görevi de görmektedir (Soghomonian, & Martin, 1998).



Şekil 7. GABA oluşumunun şematik gösterimi (Yalçınkaya *vd.*, 2019).

Son zamanlarda çalışmalar, fonksiyonel özelliğe sahip fermente gıdaların üretimi için starter kültür olarak kullanılan ve GRAS statüsüne sahip LAB'ın GABA üretim yeteneği üzerine yoğunlaşmış durumdadır (Komatsuzaki, Shima, Kawamoto, Momose, & Kimura, 2005; Ratanaburee, Kantachote, Charernjiratrakul, & Sukhoom, 2013). Yapılan bir çalışmada ekşi hamur kaynaklı laktik asit bakterilerinin GABA ürettiği belirlenmiş ve fermantasyon esnasında

GABA sentezine bağlı olarak da ekmeğin fonksiyonel özelliğini geliştirdiği sonucuna varılmıştır (Villegas, Brown, de Giori, & Hebert, 2016).

Tezin Amacı

Probiyotik kültür kullanılarak yapılan ürünlerde LAB kullanımını yaygınlık göstermektedir. Tercih edilme sebeplerine genel itibariyle bakıldığında GRAS statüsüne sahip olmaları ve konakçı sağlığını olumlu yönde etkilemeleridir. Fonksiyonel gıdalara olan ilginin artması ile birlikte probiyotik mikroorganizmalara olan ilgi de her geçen gün artmaktadır. Bu kapsamda yeni probiyotik suşların tanımlanması önem arz etmektedir. Bu tez çerçevesinde geleneksel fermente ürünlerden birisi olan ekşi hamur ve yeni doğmuş bebeğin bağırsak florasında özgün ve probiyotik olabilecek LAB suşları ierebilmeleri sebebiyle daha önce identifiye edilen LAB potansiyel probiyotik özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda, test edilen suşların EPS retimi, antibiyotik dirençliliği, antimikrobiyal ve antifungal aktivitesi, hücre yüzeyi hidrofobikliği, HT-29 hücre hattına tutunumları, düşük pH ve safra dirençliliği, hemolitik aktivitesi, simüle edilmiş gastrointestinal sistemdeki canlılıkları ve GABA üretimleri incelenmiştir.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

Materyal ve Yöntem

Materyal

Çalışmada kullanılan suşlar.

Tez kapsamında araştırma grubumuzun daha önce izole edip tanımladığı suşlardan (ilk defa bu çalışma kapsamında değerlendirilmiştir) yararlanılmış olup Tablo 5’de bu suşlar ile ilgili bilgiler yer almaktadır.

Tablo 5. Tez Kapsamından Kullanılan Bakteriyel Suşlar

Suş kodu	Mikroorganizmalar	İzolasyon kaynağı	Gelişme ortamı	Gelişim sıcaklıkları
WPS-1	<i>Lactobacillus graminis</i>	Ekşi hamur	MRS	37°C
WPS-3	<i>Lactococcus garvieae</i>	Ekşi hamur	MRS	37°C
WPS-8	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Ekşi hamur	MRS	37°C
WPS-11	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Ekşi hamur	MRS	37°C
WPS-12	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Ekşi hamur	MRS	37°C
C-9A	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Yenidoğan dışkı	MRS	37°C
C-9C	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Yenidoğan dışkı	MRS	37°C
C-6A	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Yenidoğan dışkı	MRS	37°C
C-7B	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Yenidoğan dışkı	MRS	37°C

Kültür ortamları.

Tez çerçevesinde kullanılan LAB ve diğer bakterilerin gelişimleri için kullanılan besiyerleri ve içerikleri EK-1’de verilmiştir.

Bakterilerin muhafazası.

Bakteriler uygun besiyeri ortamlarında iki kez ard arda aktifleştirilip, 2 ml ‘lik tüplerde % 40 ‘lık gliserol kullanılarak stokları hazırlanmıştır. Suşlar bu şekilde -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

Tampon ve çözeltiler.

Çalışma kapsamında kullanılan buffer ve bileşimleri EK-2' de verilmiştir.

Kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları.

Kullanılan suşların antibiyotik profilini belirlemek için disk difüzyon yöntemi kullanılmış olup kullanılan antibiyotiklerle ilgili bilgiler Tablo 6' da verilmiştir.

Tablo 6. Kullanılan Antibiyotikler ve Konsantrasyonları

Antibiyotik (Oxoid, İngiltere)	Konsantrasyon (µg)
Streptomycin (S)	10
Penicillin G (P)	10 units
Kanamycin (K)	30
Chlomphenicol (C)	30
Erythromycin (E)	15
Tetracycline (TE)	30
Oxytetracycline (T)	30
Ampicillin (AM)	10

Kullanılan primerler.

Test edilen suşların homopolimerik ve heteropolimerik *eps* genlerinin tespiti amacıyla kullanılan primerler ve hedef alınan genlerle ilgili gerekli bilgiler Tablo 7' de verilmiştir.

Tablo 7. EPS Genlerinin Tespiti Amacıyla Kullanılan Primerler

Primer	Sekans (5'-3')	Hedef gen	Referans
<i>epsA_F</i> <i>epsA_R</i>	TAGTGACAACGGTTGTTACTG GATCATTATGGACTGTCAC	Transkripsiyon düzenleyici	(Low <i>vd.</i> , 1998)
<i>epsEFG_F</i> <i>epsEFG_R</i>	GAYGARYTNCCNCARYTNWKAAYGT TGCAGCYTCWGCCACATG	p-gtf	(Mozzi <i>vd.</i> , 2006; Palomba <i>vd.</i> , 2012)
<i>LevV_F</i> <i>LevV_R</i>	GAYGTNTGGGAYWSNTGGC TCNTYYTCRTCNSWNRMCAT	<i>fff</i>	(Tieking, & Gänzle, 2005)
G--Bacta- F-36 G--Bact-a-R-27	TCATTTTATTCGTAACCTCAATTGAYGARYTNCC AATATTATTACGACCTSWNAYYTGC CA	p-gtf	(Provencher, LaPointe, Sirois, Van Calsteren, & Roy, 2003)
<i>epsB_F</i> <i>epsB_R</i>	CGTACGATTCGTACGACCAT TGACCAGTGACACTGAAGC	Zincir uzunluğu	(Dertli, Mercan, Arıcı, Yılmaz, & Sağdıç, 2016)

Y= C or T; R= A or G; W= A or T; K= G or T; S= C or G;
M= A or C; N= A,C,G or T

Kullanılan çözelti, besiyerleri ve malzemelerin sterilizasyonu.

Çalışmada kullanılan cam malzemeler, besiyerleri ve solüsyonlar 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edilmiştir.

Yöntem

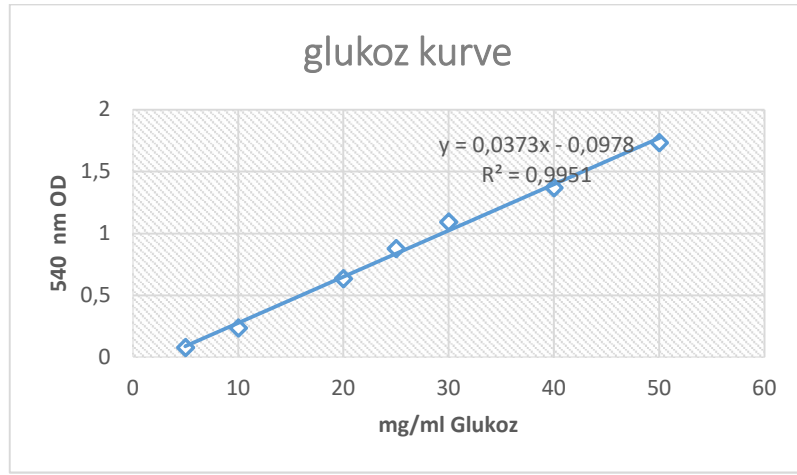
EPS üretiminin yapısal karakterizasyonu.

Bakteriyel suşların modifiye sükrözlu BHI ortamında EPS izolasyonu ve saflaştırılması.

Seçilen LAB'lar ön geliştirme işlemi yapmak için 15 ml'lik MRS broth içeren tüplere alınarak, bir gece aerobik ortamda geliştirilmiştir. Takiben %3 oranında sükröz içeren 100 ml'lik MSBHI besiyerine, kültürlerden %1 oranında inoküle işlemi uygulanmıştır (37°C'de aerobik ortamda 24-48 saat). Gelişen kültürlerin EPS izolasyonu için 5000 × g (23°C, 10 dakika)'de santrifüj işlemine tabi tutularak süpernatant ve bakteriyel çökelti elde edilmiştir. Elde edilen süpernatanta eşit miktarda etanol ilave edilerek EPS'in çökmesi sağlanmıştır. Bu şekilde hücreler 4°C'de bir gece bekletilmiştir. İnkübasyonun ardından 5000 × g'de 15 dakika 4°C'de santrifüj edilerek çöken EPS toparlanmıştır. Çöken EPS çözeltisi daha sonra suda hafif olarak ısıtılarak (50°C'de) çözünmesi sağlanmıştır. Ortamdaki protein gibi safsızlıkları elemine etmek için eps çökeltisine %80'lik TCA hazırlanıp son konsantrasyonu %4 olacak şekilde ilave edilip oda sıcaklığında 3-4 saat çalkalamalı ortamda inkübasyona bırakılmıştır. EPS çözeltisi içindeki proteinleri ve EPS' i ayırmak amacıyla 6000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirilmiş ve daha sonra çöken protein ayrılmıştır. Takiben süpernatanttaki EPS'sin pH'sı 7.0'ye ayarlanmış x3 soğuk etanol ilave edilerek 4°C'de bir gece boyunca çökme işlemine tabi tutulmuştur. Çöken EPS elde edilip H₂O'da çözülmesi sağlanmıştır. Çözündürülme işleminden sonra bir sonraki analizlerde kullanımı için -80°C'de dondurulduktan sonra liyofilizatörde kurutulmuştur (Dertli *vd.*, 2016).

DNS yöntemi ile EPS üretim miktarının belirlenmesi.

Ekzopolisakkarit miktarını belirlemek amacıyla DNS yöntemi uygulanmıştır. Bu amaçla glukoz kullanılarak standart seyreltilerle kalibrasyon kurvesi çizilmiştir (5-50 mg/ml)(Şekil 8). Liyofilizatörde kurutulmuş örneklerden 10 mg alınarak 1 ml saf suda çözündürülmüştür. Takiben ependorf tüpüne 200 µl örnek alınarak, %70 perklorik asitten 218 µl konularak 80°C'deki su banyosunda 1saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübe etikten sonra 5 dk soğumaya bırakılmış akabinde 5M KOH'tan 500 µl ilave edilerek nötralizasyon işlemi uygulanarak tuz oluşumu sağlanmıştır. Bu işlemden sonra 4°C'de 1200 x g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant 0,22 µm şırınga filtrelerden geçirilerek safsızlıklardan arındırılmıştır. EPS örneklerinden cam tüplere 100 µl alınarak üzerine 900 µl saf su ilavesi yapılmıştır. Üzerine 3 ml dinitrosalisilik asit ilave edilerek iyice vortekslendikten sonra 95°C'de 5 dk inkübe edilmiştir. İşlem bittikten sonra 5 dk soğumaya bırakılmış ve kontrole karşı OD_{540 nm}'de ölçüm alınmıştır.



Şekil 8. DNS metodunda kullanılan glukoz eğrisi.

Ekzopolisakkaritlerin monosakkarit kompozisyonunun belirlenmesi.

EPS üretim miktarının belirlenmesi için hazırlanan örnekler refraktif indeks dedektörüne sahip yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC-RID, Shimadzu) sistemine enjekte edilmiş olup enjeksiyon hacmi 20 µl olarak belirlenmiş ve kolon olarak CARBOsep CHO-682 Pb Column kolon kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 85°C’de sabit tutulmuş ve mobil faz olarak su kullanılmıştır. Örneklerin glukoz, fruktoz, maltoz ve galaktoz içerikleri, aynı sistem ve çözücü kullanılarak her bir şeker için daha önceden oluşturulmuş kalibrasyon eğrileri kullanılarak hesaplanmıştır. Her bir konsantrasyona karşılık HPLC kromatogramından elde edilen alan değerlendirilerek monosakkarit kompozisyonu belirlenmiştir (Dertli, Colquhoun, Côté, Le Gall, & Narbad, 2018)(Modifiye edilmiştir).

Suşların in vitro şartlar altında bazı probiyotik özelliklerinin tespiti.

Antibiyotik profili tespiti.

Elde edilen LAB türleri için antibiyogram testi, antibiyotik difüzyon diskleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İspirli, Demirbaş, & Dertli (2015) belirlediği metoda göre geliştirilen bakteriler 10⁷ kob/ml olacak şekilde ayarlanmış ve 100 µl MRS agara yayma yöntemi kullanılarak ekim yapılmıştır. Ardından antibiyotik diskler petri plaklarına yerleştirilmiştir. Antibiyotik uygulanan petriler 37°C’de 24 saat geliştirilerek oluşan inhibisyon zonları kaydedilmiştir. Böylelikle LAB türlerinin antibiyotik hassasiyeti belirlenmiştir.

Antimikrobiyal etki spektrumunun belirlenmesi.

Probiyotik potansiyeli araştırılan LAB suşlarının antimikrobiyal aktivitesi 5 farklı patojen mikroorganizmaya karşı kullanılmış olup Tablo 8’de gösterilmiştir. Seçilen patojenlerin hepsi TSB (Tryptic Soy Broth, Merck) besiyerinde aerobik koşullarda 37°C’de geliştirilmiştir. Test edilen suşlarda %1 oranında olacak şekilde inokülasyon işlemi yapılmıştır.

Daha sonra İspirli vd. (2015) kullanmış oldukları metoda göre antimikrobiyal aktivite testi uygulanmıştır. LAB suşların antimikrobiyal aktivitelerinin saptanması için kültür stokları 10 ml MRS broth içinde %1 oranında inokülasyon işlemi uygulanarak 37°C'de bir gece boyunca gelişmesi beklenmiştir. Gelişen hücreler 5 dakika boyunca 20000 × g'de santrifüj edilmiş santrifüj sonrası elde edilen süpernatanttan tüm hücrelere uzaklaştırmak adına süpernatant steril bir 0,22 µm şırıngadan filtre edilmiştir. Filtre edilen süpernatantın pH'sı NaOH ile pH 6.0'a ayarlanmıştır. Oluşabilecek engelleri ortadan kaldırabilmek amacıyla 30 dakika boyunca katalaz (Merck) uygulaması ile inhibisyon sağlanmıştır. Elde edilen 20 µl süpernatantları her bir suş için ayrı ayrı filtreleme işlemi yapılmış ve inhibisyon bölgelerini ölçebilmek için hedef alınan patojen suşları TSA besiyerine dökme işlemi ile ekim yapılmıştır. 37°C'de 24 saat boyunca inkübasyon işlemine takiben antimikrobiyal etki gösteren inhibisyon bölgesinin zon çapları mm cinsinden kaydedilmiştir.

Tablo 8. *Çalışmada Kullanılan İndikatör Mikroorganizmalar*

Suş kodu	Tür
P12	<i>Escherichia. coli</i> BC 1402
P60	<i>Bacillus cereus</i> BC 6830
P78	<i>Salmonella typhimurium</i> RSSK 95091
P91	<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 27729
P94	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923

Antifungal aktivitelerinin belirlenmesi.

LAB suşlarının *F. oxysporum*, *A. niger*, *P. chrysogenum*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus parasiticus*, *Alternaria alternata* küflerine karşı antifungal etkisi araştırılmıştır. Cabo, Braber, & Koenraad (2002) yaptıkları çalışmada kullandıkları metod modifiye edilerek analiz yürütülmüştür. Test edilen suşlar %1 inokülasyon olacak şekilde MRS broth içerisinde 37°C'de bir gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. MRS agar, dökülen petrilere 3 saat boyunca 37°C'de kurutularak petrilere spot yöntemi ile 10µl ekim yapılmıştır. Petrilere ters çevrilerek 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. 10 ml yumuşak PDA (%0.8 agar) içindeki küflerin üzerine LAB ekilerek 25°C'de 3 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda LAB etrafında oluşan inhibisyon zonları kaydedilmiştir

Hidrofobisite (tutunma) niteliklerinin tespiti.

Tutunma analizi Vinderola, & Reinheimer (2003) yapmış oldukları metoda göre uygulanmıştır. Bu amaç için geliştirilen kültürler, santrifüj (1200 x g, 4°C, 10 dk) işlemi uygulandıktan sonra 50 mM K₂HPO₄ (pH 6.5) ile iki defa yıkama yapılmıştır. Tekrar buffer ile resüspanse edilmiş ve OD₅₉₀ nm'de yaklaşık 1 ayarlanmıştır.. Bir cam tüp içerisine 3 ml

bakteriyel süspansiyon ve 0.6 ml n-hexadecane ilave edilerek 120s iyice vorteklenmiştir. Takiben faz ayrışması için hareket ettirmeden 20 dk boyunca 37°C inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası alt faz (sulu) dikkatlice alınıp OD₅₆₀ nm’de ölçüm yapılmıştır.

% Adezyon = $[(A_0 - A)/A_0]100$, A₀ ölçümden önceki başlangıç, A ise 20 dk ‘lık inkübasyondan sonraki OD değeridir.

Düşük pH ve safra tuzlarına karşı direncin belirlenmesi.

Düşük pH ve safra tuzu direncinin değerlendirilmesi İspirli vd. (2015) yaptıkları çalışmada belirledikleri motoda göre yapılmıştır. Suşlar aerobik şartlar altında bir gece geliştikten sonra %0.85’lik FTS ile iki defa yıkama yapıldıktan sonra bütün suşlar OD₆₀₀ nm de 1’e ayarlanmıştır. Kontrol amaçlı pH ayarlaması yapılmadan ve safra tuzu ilave edilmeden kültürler MRS ortamına %1 inoküle edilmiştir. Aynı şekilde yine %0.3 (w/v) safra tuzları içeren (Bovine bile, Sigma) ve 1M HCl ile pH 4’e ayarlanmış MRS ortamlarına kültürlerden %1 olacak şekilde inoküle edilmiştir. Bu işlemler cam tüp içerisinde gerçekleştirilerek sarsmadan 37°C inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyona bırakıldıktan sonra belirli saatler boyunca spektrofotometre (PG Instruments, T60)’de OD₆₀₀ ölçümleri yapılmıştır.

Virülans faktörünün belirlenmesi.

Hemolitik aktivitenin tespiti.

Test edilen laktik asit bakterilerinin hemolitik aktivitesi , De Vuyst, Moreno, & Revets (2003)’in belirledikleri metoda uygun yapılmıştır. Blood agara %7 oranında insan kanı (Bayburt Devlet hastanesi, Bayburt, Türkiye) ilave edilmiş ve üzerine MRS ortamında gelişen kültürler yayma yöntemine göre ekilmiştir. Daha sonra petri plakları 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Hemolitik reaksiyonda koloni çevresinde, net bir hidroliz bölgesi varsa (β hemolysis), kısmi hidroliz ile yeşilimsi zon varsa (α hemolysis) ya da reaksiyon göstermemişse (γ hemolysis) olarak değerlendirilmiştir.

Suşların *in vitro* şartlar altında gastrointestinal sistemde canlılığını koruyarak geçişinin belirlenmesi.

Sindirime benzetilen *in vitro* şartlar Nueno-Palop, & Narbad (2011)’in belirlemiş oldukları metoda göre analiz edilmiştir. MRS ortamında bir gece geliştirilen bakteriyel suşlar santrifüj (4000 g, 10 dk, 4°C) işlemi ile bir araya toplanmıştır. Toplanan hücreler PBS (Phosfat Buffer Saline) tamponu ile 2 defa yıkama işlemine tabi tutulmuş ve tekrardan aynı çözelti ile süspanse edildikten sonra OD₆₀₀ nm’de yaklaşık 1’e ayarlanmıştır. Gastrik şartlara benzetilmek için 1M HCl kullanılarak pH 3’e ayarlanmış ve son konsantrasyon %5 (w/v) olacak şekilde pepsin

(Sigma) ilavesi yapılmıştır. Oluşan mix 37°C’de çalkalayıcı da 110 rpm de 90 dk boyunca inkübe edilmiştir. Bağırsak sindirim koşullarını oluşturmak için örnekler pH 6’ya ayarlanıp son konstrasyon %0.3 (w/v) olacak şekilde safra tuzları eklenmiştir. Örnekler 150 dk boyunca 37°C ve 110 rpm de çalkalayıcı da inkübe edilmiştir. Her inkübasyon sonunda hücre sayılarını belirlemek için seri dilüsyonlar hazırlayarak, MRS agara ekim yapılmış ve 37°C’de 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Çalışma kapsamında referans suş olarak *Lb. rhamnosus* GG kullanılmış olup çalışma sonunda her bir suşun sindirim öncesi ve sindirim sonrası hücre sayıları karşılaştırılarak hayatta kalma yüzdeleri hesaplanmıştır.

LAB suşlarının HT-29 insan epitelyum hücrelerine tutunma analizi.

Kolon hücrelerine tutunma probiyotik fonksiyonların sağlanması açısından önemli bir parametredir. Bu amaçla test edilen 9 LAB suşu 1 gece 37°C’de anerobik şartlarda geliştirilerek HT-29 hücrelerine tutunma oranları belirlenmiştir. HT-29 hücreleri, %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal buzağı serumu (Invitrogen), 1% MEM elzem olmayan aminoasitler (Sigma) ve 1% penisilin/streptomisin (Sigma) ile katkılanmış DMEM (sigma) doku kültür besiyerinde T75 kaplarında 37°C’de ve %5 CO₂ şartlarında geliştirilmiştir. 3-4 günlük gelişiminin ardından hücreler %80 oranında geliştikten sonra %0.25 tripsin-EDTA (Sigma) kullanılarak kaplardan ayrıştırılmıştır. Tutunma çalışmaları için 24-gözlü plastik kaplara hücre miktarı 6×10^4 hücre/cm² olacak şekilde ekim yapılarak (hemocytometer ile belirlenir) 2 gün boyunca hücreler gelişmeye bırakılmıştır. Tutunma testine tabi tutulacak LAB konsantrasyonu spektrofotometre kullanılarak OD₆₀₀ nm’de 1’e ayarlanmıştır. Bakteri hücreleri daha sonra DMEM besiyerinde (antibiyotik içermeyen) yaklaşık olarak 1×10^7 hücre/ml olacak şekilde seyreltilerek ve MRS agara ekim yapılmıştır. Anerobik olarak geliştirilen suşların tutunma öncesi toplam bakteri sayısı cfu birimi ile belirlenmiştir. Ardından bu solüsyondan 1 ml geliştirilerek HT-29 hücrelerine ekilmiş ve 2 saat boyunca 37°C’de %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir. Tutunmayan bakterilerin uzaklaştırılması amacıyla 3 defa yıkama işlemi uygulanmış ve bu işlemin sonunda HT-29 hücrelerine 1 ml tripsin/EDTA eklenerek hücreler plakalardan ayrılması sağlanmıştır. Bu işlemde hemen sonra seri seyreltme işlemine tabi tutularak MRS agara ekim yapılarak 24-48 saat 37°C’de geliştirmeye bırakılmıştır. Böylece HT-29 hücrelerine tutunmuş bakteri sayısı belirlenmiştir. Tüm bu işlemler sonunda tutunmuş bakteri sayısı % olarak ifade edilmiştir (Horn *vd.* , 2013).

Moleküler biyoloji işlemleri.

Genomik DNA izolasyonu.

Geliştirilen kültürlerden ependorf tüpü içerisine 1 ml alınarak 10 dakika 7000 x g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj aşamasından sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre pelleti bir araya toplanmıştır. Bu şekilde toplanan bakteri hücrelerinin üzerine 450 µl TE (Tris EDTA) tamponundan ilave edildikten sonra hücrelerin tampon içerisinde süspanse olması sağlanmıştır. Daha sonra süspanse edilen hücrelere, 50 µl %10 luk SDS (Sodyum dodesil sülfat) ve 2 µl Proteinaz K ilave edilip iyice vorteksleniş ve 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 0.5 ml fenol:kloroform:isoamil alkol (25:24:1) karışımından ilave edilip tüpler baş aşağı çevrilerek iyice karıştırılmış ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İçerik 4°C'de 10 dakika 7000 x g'de santrifüjlendikten sonra elde edilen süpernatant benzeri yüksek viskoziteli jel otomatik pipet kullanılarak toplanıp yeni bir tüpe aktarılmıştır. İşlem fenol-kloroform-isoamil alkol karışımı ile bir kez daha tekrarlanıp oluşan süpernatant benzeri yüksek viskoziteli jel yeni bir tüpte toplanmıştır. 5M'lık sodyum asetatın 50 µl içeriğe ilave edilip hafifçe karıştırılmıştır. Sonrasında içeriğe 1 ml izopropanol ilave edilerek çöken DNA'nın beyaz iplikçikleri oluşana kadar ters-düz edilerek hafifçe karıştırılmıştır. İçerik 5000 rpm de 10 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant uzaklaştırılıp, elde edilen pelet üzerine 0.5 ml %70'lik etanol ilave edilip hafif karıştırılmıştır. Bu işlemi takiben içerik 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kalan etanolü uzaklaştırmak için içerik 37°C'de 5-10 dakika bekletilmiş ardından elde edilen DNA 100 µl distile su ilave edilerek süspanse edilmiştir (İspirli, 2016).

Homopolimerik ve heteropolimerik EPS üretiminden sorumlu genlerin tespiti.

Seçilen LAB türlerinde EPS üretiminden sorumlu *fff* ve *p-gtf* genlerinin varlığı PCR (Polymerase Chain Reaction-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile araştırılmıştır. Bu LAB türlerindeki genlerin tespit edilmesi amacıyla kullanılmış primerler Tablo 7'de verilmiştir

PCR ile eps genlerinin amplifikasyonu.

Ekşi hamur ve yenidoğan dışkısından identifiye edilen LAB türlerinde EPS üretiminin araştırılması amacıyla test edilen türlerde olabileceği varsayılan *fff* ve *p-gtf* genleri PCR ile tespit edilmiştir. Bu kapsamda literatürde daha önce tanımlanmış homopolimerik EPS üretiminden sorumlu genin tespiti için Lev (*fff*) primer çifti kullanılmış iken, heteropolisakkarit EPS üretiminden sorumlu gen kümesinin tespiti için *epsA*, *epsB*, *epsEFG*, G*- Bact-a primer çiftleri kullanılarak bu genlerin varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla hazırlanan PCR karışımı Tablo 9'da verilmiş iken, PCR şartları da Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 9. *EPS genlerinin Amplifikasyonu için Oluşturulan PCR Karışımı*

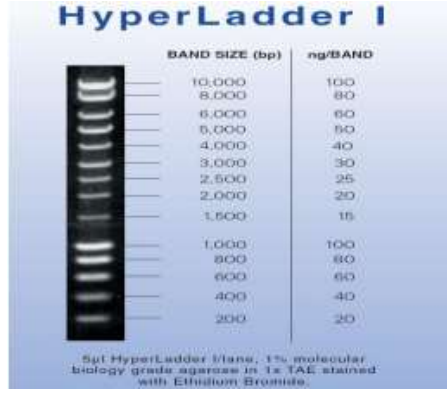
Bileşim	Miktar (50 µl)
Deiyoinize H2O	32.75
5X Phusion Buffer	10
dNTP miks	4
Primer I	1
Primer II	1
Taq polimeraz	0.25
DNA	1

Tablo 10. *EPS Genlerinin Amplifikasyonu için Oluşturulan PCR Şartları*

	Ön Denatürasyon	94 °C 30 s	1 döngü
<i>epsA_F</i>	Denatürasyon	94°C 15s	
<i>epsA_R</i>	Bağlanma	43 °C 30s	35 döngü
	Uzama	72 °C 1 dk	
	Ön Denatürasyon	94 °C 30 s	1 döngü
<i>epsB_F</i>	Denatürasyon	94°C 45s	
<i>epsB_R</i>	Bağlanma	43 °C 1 dk	35 döngü
	Uzama	72 °C 1 dk	
	Ön Denatürasyon	94 °C 30 s	1 döngü
<i>epsEFG_F</i>	Denatürasyon	94°C 30s	
<i>epsEFG_R</i>	Bağlanma	49 °C 45s	30 döngü
	Uzama	72 °C 1 dk	
	Ön Denatürasyon	94 °C 30 s	1 döngü
G-*-Bacta- F-36	Denatürasyon	95°C 30s	
G-*-Bacta-R-27	Bağlanma	42 °C 45s	35 döngü
	Uzama	72 °C 1 dk	
	Ön Denatürasyon	94 °C 30 s	1 döngü
<i>LevV_F</i>	Denatürasyon	95°C 30s	
<i>LevV_R</i>	Bağlanma	42 °C 45s	35 döngü
	Uzama	72 °C 1 dk	

PCR ürünlerinin jel elektroforezinde kontrolü.

PCR ürünlerinin jel elektroforezinde kontrolü için konsantrasyonu %1 olan agaroz jel 0.5X Tris borat EDTA(TBE) tamponu kullanılarak hazırlanmıştır. Elektroforeze yüklemeye önce PCR ürününden 5-10 µl alınmış ve bir yükleme boyası ile boyanmıştır. Daha sonra boyanan ürün jeldeki kuyucuklara yüklenmiş ve TBE bufferi kullanılarak jelde elektroforez işlemi uygulanmıştır. Elektroforez işleminin ardından jelde yüklü olan DNA parçacıklarını UV ışık altında görünmesi için 1 mg/L'lik etidyum bromid çözeltisi içerisinde 30 dakika bekletilmiştir. Bu işlemden sonra jeller distile suyun içerisine daldırıp çıkartılarak durulama işlemi yapılmıştır. PCR ürünlerinin görüntülenmesi için UV Transilluminatör (Cleaver) kullanılmış olup Hyperladder I (Bioline, UK) elektroforetik jelde DNA boyutlayıcısı olarak kullanılmıştır. Ladder'ın boyutları ve miktarları Şekil 9'da verilmiştir.



Şekil 9. Hyperladder I (Bioline, UK) fragment boyutları ve miktarları.

Filogenetik analiz.

Filogenetik sınıflandırma, türlerin birbirleriyle olan evrimsel ilişkilerini incelemektedir. Birbirleriyle olan genomik benzerlik ve farklılığına göre ayırım yapılmaktadır. İçlerindeki en çok kullanılanlardan bir tanesi de DNA benzerliğidir. Tez çerçevesinde incelenen bakterilerin filogenetik ilişkisi yapılırken, MEGA 7.0 programında filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

γ- Aminobutirik asit (GABA) üretimi.

Glutamik asit dekarboksilaz (GAD) gen varlığının LAB suşlarında taranması.

Çalışma kapsamında kullanılan LAB suşlarındaki GAD geninin moleküler tespiti Core_F (5'-CCTCGAGAAGCCGATCGCTTAGTTCG-3') ve Core_R (5'TCATATTGACCGGTATAAGTGATGCCC) primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir PCR karışımı; Taq Polimeraz tamponu (Promega) , 2.5 mM dNTPs (Bioline), 1.5 U Taq polimeraz (Promega) ve 20 mM Core_F ve Core_R primerlerini içermektedir. PCR işlemi 95°C 2 dk, 95°C'de 30 s, 60°C'de 20 dk, 72°C'de 30s ve son uzatma 72°C'de 5 dk olmak koşuluyla 20 döngü halinde programlanmıştır. PCR karışımını hazırlamak için yukarıda verilen içerik dikkate alınarak reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Amplifiye edilen PCR ürünlerinin ayırımı için %1 (w/v) agaroz jel kullanılmış olup 50 dk saat boyunca 90 V şartlarında elektroforez işlemi uygulanmıştır. Pozitif suşlarda 600 bp'lik bir ampikon tespit edilmiştir (Demirbaş, İspirli, Kurnaz, Yılmaz, & Dertli, 2017)(Modifiye edilmiştir).

GABA üreten LAB suşlarının tespiti.

Ekşi hamur ve bebek dışkısı kaynaklı LAB türlerinin GABA üretiminin taranmasında Villegas vd. (2016) yaptıkları metod modifiye edilerek analiz yürütülmüştür. Tez kapsamında incelenen bütün suşlar 30°C'de 96 saat boyunca 53 mM MSG (Monosodyum glutamat) içeren MRS ortamında geliştirilmiştir. Gelişen kültürler 6000 x g'de 15 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant toplanmış ve GABA üretimi TLC'de (Thin Layer Chromatography- İnce Tabaka

Kromatografisi) süpernatant fraksiyonları değerlendirilmiştir. TLC tabakası üzerine süpernatantan 4 µl spotlayıp n-butanol: asetik asit: distile su (4:1:1) çözücü karışımında yürütme işlemini gerçekleştirdikten sonra %0.2 (w/v) ninhidrin içeren çözeltiliye daldırılmıştır. Daha sonra oluşan noktaları görselleştirmek için ısı uygulanmıştır.

GABA üretim seviyelerinin belirlenmesi.

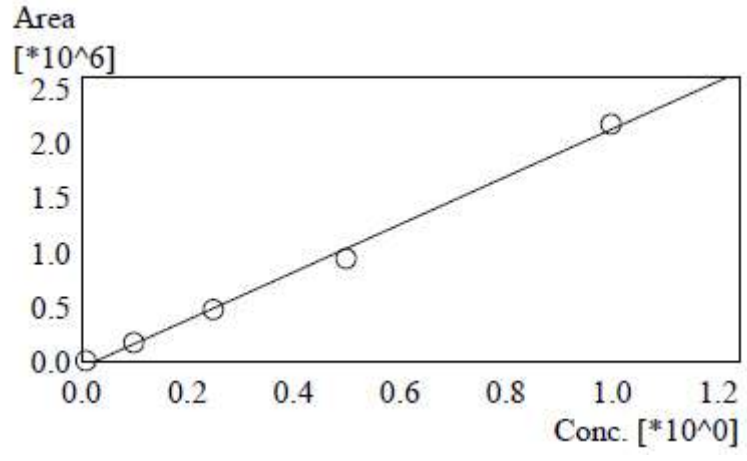
Çalışma kapsamında kullanılan LAB suşlarının GABA üretim seviyeleri Tuberoso, Congiu, Serreli, & Mameli (2015) yapmış oldukları çalışmada belirlemiş oldukları metodun modifiye edilmesiyle belirlenmiştir.

Amino asidin türevlendirilmesi.

Reaksiyon 1.5 mL ependorf tüpünün içerisinde gerçekleşmiştir. Gelişen kültürlerin süpernatantlarından 100 µl alınarak santrifüj tüpüne konulmuştur. Her bir örneğin üzerine 100 µl dansil klorür (türevlendirme maddesi) ilave edilmiş ve son hacim 1000 µl olacak şekilde 0.2 M Na₂B₄O₇.10H₂O (pH 9.3) eklenerek karışım elde edilmiştir. Elde edilen içerik 30 dakika boyunca 40°C'de ultrasonik bir banyoda inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi biten örnekler 12.000 rpm'de 10 dk'lık santrifüj işlemine tabi tutulduktan sonra süpernatant MeOH (1:1, v/v) ile seyreltilmiştir (Tuberoso *vd.*, 2015).

HPLC analizi.

GABA içeriği, bir Inertsil ODS 3 kolonu (GL science, 5 µm, 4.6 x 250 mm) ile donatılmış bir HPLC (Shimadzu) sistemi kullanılarak 295-500 nm dalga boyunda analiz edilmiştir. Mobil faz olarak solvent A (6.25 mL asetik asit, 1.97 g sodyum asetat, 200 mL asetonitril, 1 L su) ve solvent B (Asetonitril) kullanılmıştır (1:1, v/v). Örneklerden 1 µl enjeksiyon yapılmıştır. Daha önceden de tarif edildiği üzere 1 mL/dk akış hızındaki 25°C'lik bir kolon sıcaklığında ayırım sağlanmıştır. Türevlendirilen GABA'dan dolayı oluşan foton diyot dizisi floresan dedektörü tarafından tespit edilmiştir. GABA idendifikasyonu, standart olarak kullanılan GABA'nın (Sigma-Aldrich) alıkonma süreleri ile örneklerin alıkonma süreleri karşılaştırılarak yapılmıştır. Örneklerde bulunan GABA konsantrasyonlarını belirlemek için, farklı konsantrasyonlarda (0.01-0.1-0.25-0.50-1.0 mg/mL) hazırlanan standartların test edilmesi ile LAB suşlarının süpernatantlarında ki GABA seviyeleri belirlenmiştir. GABA standart eğrisinin regrasyon çizgi katsayısı R²: 0.9959644 olup kalibrasyon eğrisi Şekil 10'da verilmiştir.



Şekil 10. GABA standardının kalibrasyon eğrisi.

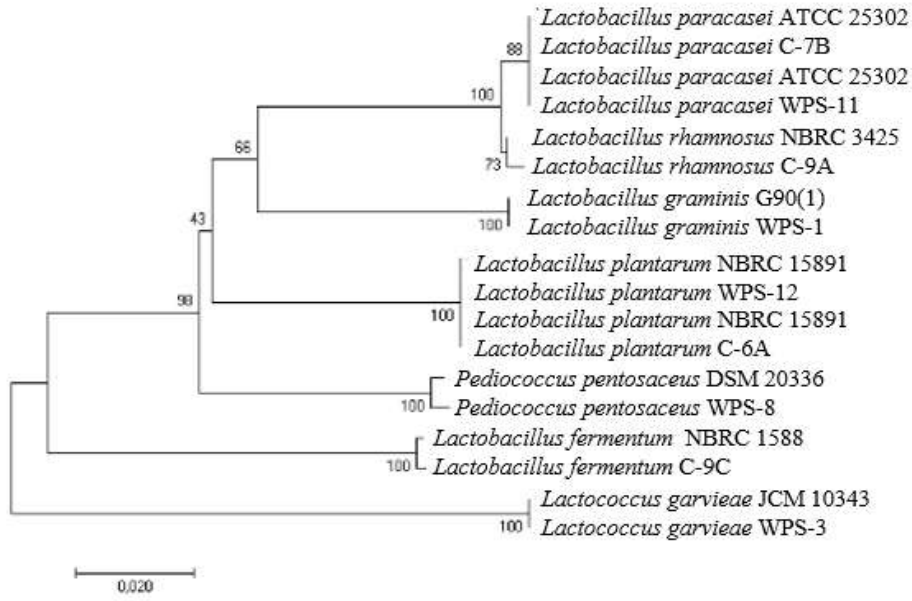
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

Araştırma Bulguları ve Tartışma

Filogenetik İlişki

LAB'lar birçok fermente ürünün oluşumunda starter kültür olarak kullanımlarıyla birlikte, insan ve hayvan sağlığı üzerinde yararlı etkiler oluşturmaları ile probiyotiklerin büyük bir kısmını da barındırmaktadırlar. Özellikle ekşi hamur, tarhana gibi tahıl ürünleri, kefir, kıymız, yoğurt gibi fermente süt ürünlerinin yanı sıra, salamura zeytin ve turşu benzeri fermente bitkisel ürünlerin üretiminde başlıca rol almaktadırlar (Blandino, Al-Aseeri, Pandiella, Cantero, & Webb, 2003). Yapılan birçok çalışmada, LAB türlerinin fermantasyon boyunca gıdanın besinsel değerini, raf ömrünü ve dayanıklılığını artırmada yardımcı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca probiyotik özellik göstermesi nedeniyle de sağlık üzerinde olumlu etkisi vardır.

Ekşi hamur, LAB suşları ve aktif maya türlerinin metabolik faaliyetleri sonucu oluşan fermente bir ürün olarak bilinmektedir. Yapılan mikrobiyolojik çalışmalarla birlikte ekşi hamurda önemli sayıda LAB türünün olduğu bildirilmiştir. Geleneksel olarak üretilen ekşi hamurlarda, heterofermantatif LAB türleri ortama hakim olmaktadır. Aslında bu durum avantaj olarak görülmektedir. Heterofermantatif LAB türlerinin fermantasyon sonunda asetik asit gibi organik asitleri oluşturmaya bağlı olarak hamurun lezzeti de olumlu yönde etkilenmektedir. Ekşi hamurda sık rastlanılan cinsler *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella* ve *Pediococcus* olurken, *Lactococcus*, *Enterococci* ve *Streptococci* cinsleri nadir olarak görülmektedir (De Vuyst, & Neysens, 2005). Yapılan bu çalışmada ise, ekşi hamur kaynaklı *Lb. plantarum* WPS-12, *Lb. paracasei* WPS-11, *Lb. graminis* WPS-1, *Lc. garviea* WPS-3 ve *P. pentosaceus* WPS-8 suşları kullanılmıştır.



Şekil 11. Ekşi hamur ve yenidoğan dışkıları kaynaklı lab suşlarının 16s rRNA dizi analizine dayanan filogenetik ilişkisi.

Şekil 11’de LAB suşlarının filogenetik ilişkisi verilmektedir. Bu çalışmada kullanılan suşlar ile çeşitli kültür koleksiyonlarında yer alan mikroorganizmaların 16S rRNA genleri filogenetik ağaca dahil edilerek bu türler arasındaki ilişki gösterilmeye çalışılmıştır. Şekil 11’de görüldüğü üzere her bir mikroorganizma türü bir grup oluşturacak şekilde filogenetik ağaçta yerini almıştır. *Lb. paracasei* ve *Lb. rhamnosus* suşları genetik olarak daha yakınken, *Lb. graminis* suşları da bu iki türe yakın ancak farklı bir grup şeklinde filogenetik ağaçta konumlanmıştır. *Lb. plantarum* suşları da ayrı bir grup olarak bu diğer üç gruba yakın bir yerde yerini almıştır. İlginç olarak *P. pentosaceus* ayrı fakat yukarıda bahsi geçen dört LAB türüne daha yakında filogenetik ağaçta konumlanmıştır. *Lb. fermentum* suşları da ayrı bir şekilde filogenetik ağaçta yerini alırken, son olarak *Lc. garvieae* suşları diğerlerine göre filogenetik ağacın farklı noktasında yer alarak konumlanmıştır.

Anne sütü, bebekler için ideal bir besin olarak kabul edilmektedir (Kunz, Rodriquez-Palmero, Koletzko, & Jensen, 1999). Bu yüzden biyolojik yararı yüksek olan besinin, bebeğin bağışıklık sisteminde önemli bir yere sahip olmaktadır. Hall, Cole, Smith, Fuller, & Rolles (1990), bebek dışkılarına dair yaptıkları çalışmada, gününü tam olarak doldurmuş bebeklerin dışkılarında çoğunlukla *Lactobacillus* cinslerinin bulunduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca beslenme şeklinin kolonizasyonda önemli olduğunu öngörmüşlerdir. Buna benzer yapılan başka çalışmalarda ise, bebek dışkılarından *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. paracasei* ve *Lb. fermentum* türleri izole edilmiştir (Ahrné vd., 2005; Khalil vd., 2007). Yapılan bu çalışma da

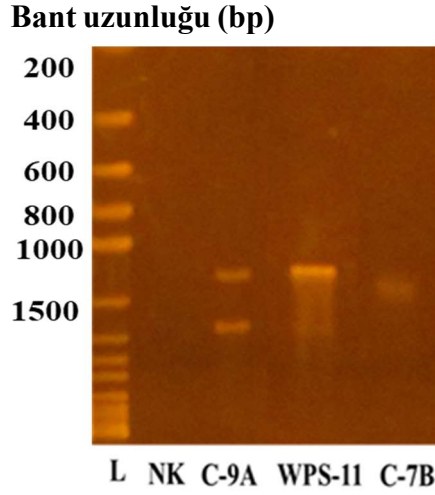
ise, bebek dışkısı kaynaklı *Lb. plantarum* C-6A, *Lb. rhamnosus* C-9A, *Lb. paracasei* C-7B ve *Lb. fermentum* C-9C suşları kullanılmıştır.

Homopolimerik ve Heteropolimerik *eps* Gen Kümelerinin Tespiti

Ekşi hamur ve yenidoğan dışkısı kaynaklı LAB suşlarının EPS üretme yeteneklerinin ve *eps* genlerinin saptanması amacıyla ilgili genlerin amplifikasyonu için istenilen gen bölgesine özgü primerler kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Şekil 12’de, Tablo 7’de verilen primerler vasıtasıyla gerçekleştirilen PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen ampliconu gösteren agaroz jel görüntüsü verilmektedir. Ayrıca test edilen suşlarda hangi gen veya gen kümesinin olduğu Tablo 11’de ifade edilmiştir.

LAB türleri hem homopolimerik hem de heteropolimerik EPS üretme kabiliyetine sahip olmaktadır. Homopolimerik çoğunlukla gluklan ya da fruktan tipi EPS olarak bilinmektedirler. Oluşan bu polimerlerin üretiminden sorumlu genler sırasıyla *gtf-ftf* olarak literatürde belirtilmektedir.

Yapılan çalışmalarda, *Lb. reuteri*’nin safraya maruz kalmasından sonra EPS biyosentezi sırasında homolog *epsB*, *epsC* ve *epsE* dahil olmak üzere ekspresyonlarında bir azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Literatürde fonksiyonları tartışılan *eps* gen kümelerinde yer alan *epsB* ve *epsC*’nin fosfor regülatör sisteminde Streptokoklar’ın EPS biyosentezinde yer alarak zincir uzunluğunu düzenleyen protein olduğu bilinmektedir (Lebeer *vd.*, 2008). Bu kapsamda incelenen ekşi hamur ve yenidoğan dışkısından izole edilen suşların genomları heteropolimerik *eps* gen kümesinde yer alan *epsA* (transkripsiyon düzenleyici), *epsB* (zincir uzunluğundan sorumlu protein), *p-gtf* ve homopolimerik *eps* üretiminden sorumlu *ftf* geninin varlığı, ilgili primerler kullanılarak PCR ile taranmıştır. Şekil 12’de, *epsEFG* geninin test edilen suşların genomlarında bulunup bulunmadığını gösteren jel görüntüsü gösterilmektedir.



Şekil 12. Test edilen suşlarda *epsEFG* geninin taranması sonucu oluşan PCR görüntüsü (L: Ladder, NK: Negatif Kontrol, C-9A: *Lb. rhamnosus*, WPS-11: *Lb. paracasei*, C-7B: *Lb. paracasei*).

Heteropolimerik *eps* gen kümesinde yer alan *epsEFG* geninin taranması için ilgili primerler kullanılarak amplifiye edilmiş ve bu amplifikasyon sonucunda test edilen suşlardan *Lb. paracasei* WPS-11, *Lb. paracasei* C-7B ve *Lb. rhamnosus* C-9A suşu *epsEFG* geni açısından pozitif oldukları tespit edilmiştir. *Lb. paracasei* ve *Lb. rhamnosus* türlerinde amplifiye edilen baz boyutunda farklılık gözlemlenmiştir. Bu durumun sebebi olarak türdeki gen farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Yapılan bir takım çalışmalarda *p-gtf* geni taranmış ve *Lb. brevis* E-25, *Lb. fermentum* KR1,KR2,KR8,AS1 suşlarında ve *Lb. helveticus* AS15 suşunda pozitif olduğu sonucuna varılmıştır (Dertli vd., 2016; Ispirli, & Dertli, 2017). Genel itibariyle çalışmalara bakıldığında, bilgilerimize göre *Lb. rhamnosus* ve *Lb. paracasei* türü çalışılmamıştır. Yapılan bu çalışma ile bahsi geçen türlerin *epsEFG* (*p-gtf*) genine sahip olduğu tespit edilerek literatüre kazandırılmıştır.

Tablo 11. LAB Suşlarının Homopolimerik EPS (*LevV*) ve Heteropolimerik EPS (*epsA*, *epsEFG*, *epsB*, *epsE*) Genlerinin Taranması

	<i>epsA</i>	<i>epsEFG</i>	<i>epsB</i>	<i>epsE</i>	<i>LevV</i>
Hedef gen		p- <i>gtf</i>		p- <i>gtf</i>	<i>ftf</i>
DNA Amplikon boyutu (bp)	800	1600	1150	189	800
C-9C	-	-	+	+	-
WPS-3	-	-	+	-	-
WPS-11	-	+	+	+	-
WPS-8	-	-	-	-	-
WPS-12	-	-	+	-	-
C-6A	-	-	-	-	-
C-7B	-	+	-	-	-
C-9A	+	+	+	+	-
WPS-1	-	-	+	+	+

*+ ilgili genin bulunduğu - ise; ilgili genin bulunmadığına işarettir.

PCR işlemi sonucunda 1150 bazlık bir ürün eldesi için *epsB* geninin varlığı taranmış Vuyst, & de Ven (1998) ve Tablo 11'den görüleceği üzere suşlar arasında pozitif sonuç veren *Lb. rhamnosus* C-9A, *Lb. graminis* WPS-1, *Lb. paracasei* WPS-11, *Lb. plantarum* WPS-12, *Lb. fermentum* C-9C ve *Lc. garvieae* WPP-3 suşları olmuştur. Sonuç olarak test edilen 7 türden 6'sının *epsB* geni açısından pozitif çıkması heteropolimerik *eps* üretiminin varlığına ışık tutmaktadır. Tez kapsamında incelenen iki farklı kaynaktan 2 aynı tür (*Lb. paracasei* WPS-11, C-7B ve *Lb. plantarum* WPS-12, C-6A) bulunmasına rağmen ekşi hamur izolatlardan olan *Lb. paracasei* WPS-11 ve *Lb. plantarum* WPS-12 suşlarının, *epsB* geni bakımından pozitif olması dikkat çekmektedir. Yapılan son çalışmalar, ekşi hamur kaynaklı LAB türlerinin heteropolimerik *eps* üretimi gerçekleştirdiği yönündedir (Galle, Schwab, Arendt, & Gänzle, 2011). Yukarıda bahsedildiği gibi amplifiye edilen bp suş bazındaki genetik farklılıktan kaynaklanmaktadır.

İspirli, & Dertli (2017), yaptığı çalışmalarda *epsB* geninin varlığını, *Lb. fermentum* KR1, KR2 ve KR8 suşlarında tespit etmiştir. Yine başka bir çalışmada ise, Türk yoğurdundan *Lb. plantarum*' un da dahil olduğu 4 farklı tür izole etmişlerdir. Bu kapsamda inceledikleri *Leuconostoc mesenteroides* Y35, *Lb. bulgaricus* Y39 ve *S. thermophilus* Y102 suşlarında *epsB* genini tespit ederken, *Lb. plantarum* Y36 suşunda tespit etmemişlerdir (İspirli, & Dertli, 2018). Yapılan tez çalışmasında ise, ekşi hamurdan izole edilen *Lb. plantarum* WPS-12 suşunda bahsi geçen gen tespit edilmiştir. Benzer olarak yapılan başka bir çalışmada ise, ekşi hamurdan izole edilen 11 LAB türünden sadece 3 türün *epsB* geni içerdiğini tespit etmişlerdir (Dertli vd., 2016).

Daha önceden tasarlanmış (Low vd., 1998) ve yaklaşık olarak 800 bazlık bir kısmı amplifiye etmesi beklenen primer seti kullanılarak *epsA* geninin varlığı *Lb. rhamnosus* C-9A suşunda tespit edilmiştir. *epsA* geninin varlığı heteropolimerik *eps* üretimi gerçekleştirme

ihtimalini düşündürmektedir. Dertli vd. (2016) ekşi hamurdan izole ettikleri LAB suşlarıyla ilgili yaptıkları çalışmada, *Lb. rossiae* ED-1, *Lb. brevis* E-25, *W.paramesenteroides* N7, *Leuc. mesenteroides* N6 ve *Lb. curvatus* N19 suşlarında *epsA* geninin varlığı saptanmıştır. Yapılan bu çalışmada ise, ekşi hamur bazlı LAB suşlarında *epsA* geni tespit edilmemiştir.

İspirli, & Dertli (2018) geleneksel Türk yoğurdundan LAB suşları izole etmiş ve tanımladığı *Leuc. mesenteroides* Y35, *Lb. plantarum* Y36, *Lb. bulgaricus* Y39 ve *S. thermophilus* Y102 suşlarında *epsA* geninin varlığını tespit etmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada ise Ventrino, Pepe, Piccolo, Mazzei, & Blaiotta (2012), *Leuc. mesenteroides* A52 ve A57 suşlarının, *epsA* geni açısından pozitif olduğunu gözlemlemişlerdir.

İspirli, & Dertli (2017), kıymız ve kuruttan izole ettiği laktik asit bakterilerinin karakterizasyonunu yapmayı amaçlamışlardır. Bu kapsamda identifiye ettikleri *Lb. fermentum* ve *Lb. helveticus* suşlarının EPS üretimden sorumlu genlerin tespitini yapmış ve *Lb. fermentum* AS3 *Lb. fermentum* AS13 ve *Lb. helveticus* suşlarında *epsA* geni tespit etmişlerdir.

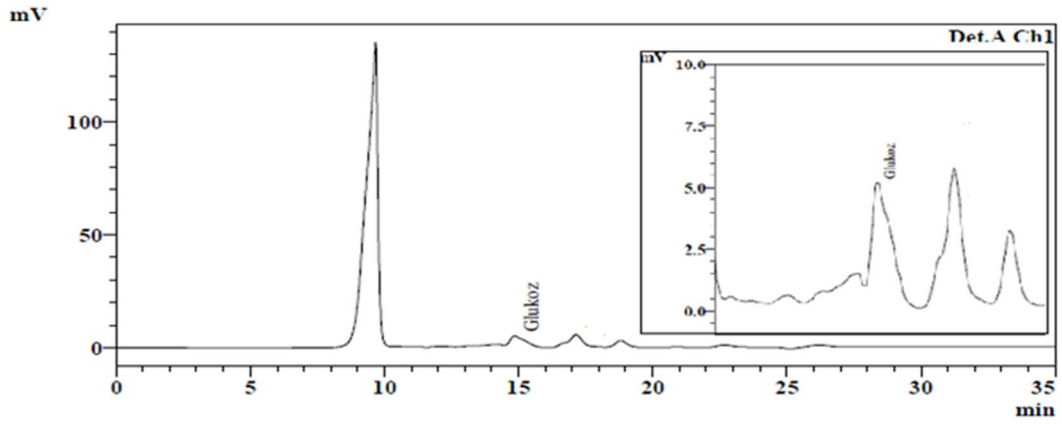
Tablo 11'den görüldüğü üzere fruktan tipi *eps* üretimin sorumlu *LevV* geni *Lb. graminis* WPS-1 suşunda pozitif çıkmıştır. Önceki çalışmalarda ekşi hamurdan izole edilen laktobasillerin (*Lb. sanfranciscensis*, *Lb. fermentum*, *Lb. pontis* *Lb. reuteri*), *Leuc. mesenteroides* ve *Weissella* suşlarının çeşitli fruktan (levan ya da inulin) ve gluklan (dextran, reuteran ya da mutan) tipi EPS ürettikleri tespit edilmiştir (Tieking, & Gänzle, 2005). Yapılan bu çalışmada ise, ekşi hamur kaynaklı *Lb. graminis* WPS-1 suşunun *LevV* geni içerdiği tespit edilmiştir. Literatürde *Lb. graminis* türünün *LevV* geni ürettiğine dair çalışma, bizim bilgilerimize göre bulunamamıştır. Dolayısıyla çalışmamızda elde edilen sonuç, literatüre yeni kazandırılmıştır.

İspirli, & Dertli (2018) yoğurttan izole ettiği 4 LAB suşunda *Lev* geni tespit etmemişken, bazı araştırmacılar yaptıkları incelemeler sonucunda *Lb. sanfranciscensis* ED-5, *Lb. paraplantarum* E-106, *W.cibaria* N9 *Lb. paraplantarum* N15 (Dertli vd., 2016), *Lb. fermentum* AS3, AS13 ve *Lb. helveticus* AS15 suşlarında *Lev* geni tespit etmişlerdir.

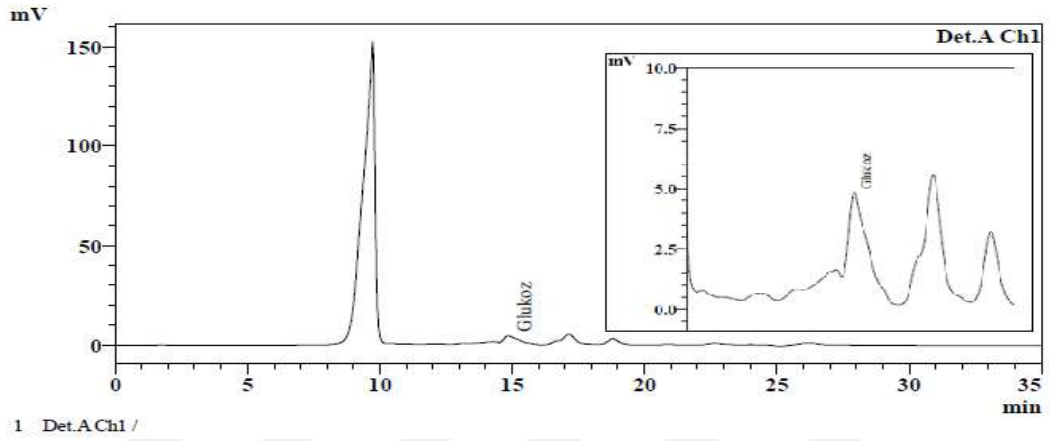
Bu çalışma kapsamında p-*gtf* genlerinin taranması için 2 farklı primer seti kullanılmış ve Tablo 11'den görüldüğü üzere *Lb. rhamnosus* C-9A, *Lb. graminis* WPS-1, *Lb. paracasei* WPS-11 ve *Lb. fermentum* C-9C suşunda p-*gtf* geni gözlemlenmiştir. Bu kapsamda *Lb. rhamnosus* C-9A suşunun *epsA*, *epsB* ve p-*gtf* genleri taşıması sebebiyle, heteropolimerik *eps* ürettiği düşünülmektedir. Hem jeldeki görüntülerden hemde Tablo 11'den de anlaşılacağı üzere *Lb. plantarum* C-6A ve *P. pentosaceus* WPS-8 suşları dışında diğer tüm suşlar homopolisakkaritlerin (HOPS) veya heteropolisakkaritlerin (HEPS) üretiminden sorumlu *eps* genlerini taşımaktadırlar.

Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimini Yapısal Karakterizasyonu

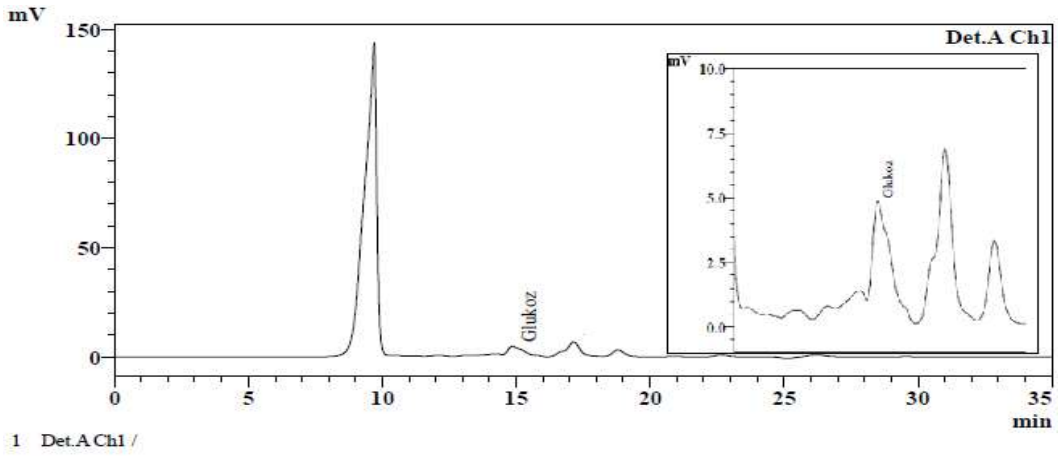
Modifiye sükrözlu BHI ortamında geliştirilen LAB suşlarının (*Lb. rhamnosus* C-9A, *Lb. plantarum* WPS-12, *Lb. fermentum* C-9C, *Lb. plantarum* C-6A, *Lb. paracasei* C-7B, *Lb. graminis* WPS-1, *Lc. garvieae* WPS-3, *P. pentosaceus* WPS-8 ve *Lb. paracasei* WPS-11) EPS yapısında yer alan şeker gruplarının tespiti için HPLC işlemi uygulanmıştır. Analiz sonunda bütün LAB türlerindeki EPS üretimini miktarsal açıdan farklılık arz ettiği ve HPLC’de bütün türlerde şeker ünitelerinde glukoz monomerine sahip olduğu tespit edilmiştir (Bazı suşlarda safsızlık olduğu düşünülen piklerde bulunmaktadır). HPLC işlemi sonucunda glukozun alıkonma süresi 14.832 ile 15.134 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Şekil 13-21’de sırasıyla *Lb. plantarum* WPS-12, *Lb. paracasei* WPS-11, *P. pentosaceus* WPS-8, *Lc. garvieae* WPS-3, *Lb. graminis* WPS-1, *Lb. fermentum* C-9C, *Lb. rhamnosus* C-9A, *Lb. paracasei* C-7B ve *Lb. plantarum* C-6A’ya ait HPLC kromatogramları verilmiştir.



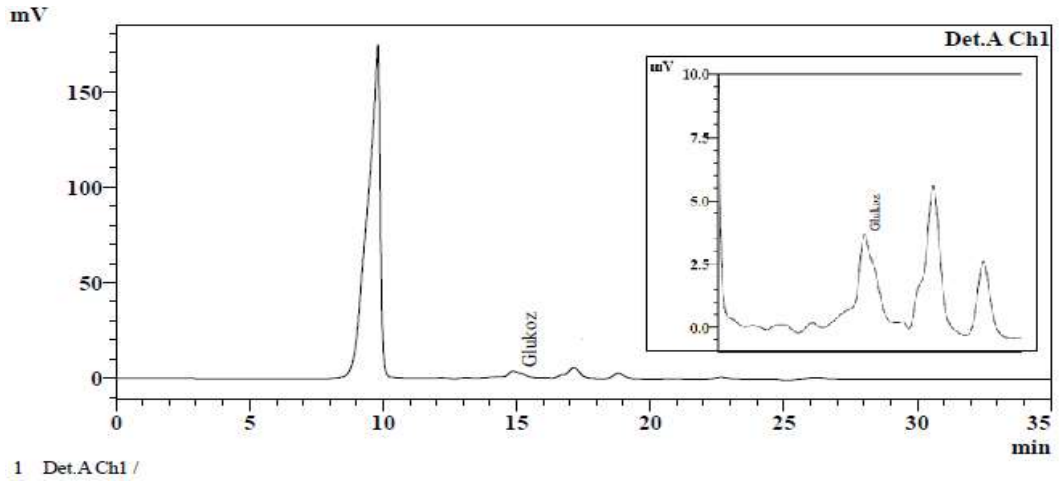
Şekil 13. *Lb. plantarum* WPS-12 tarafından üretilen EPS' in HPLC kromatogramı.



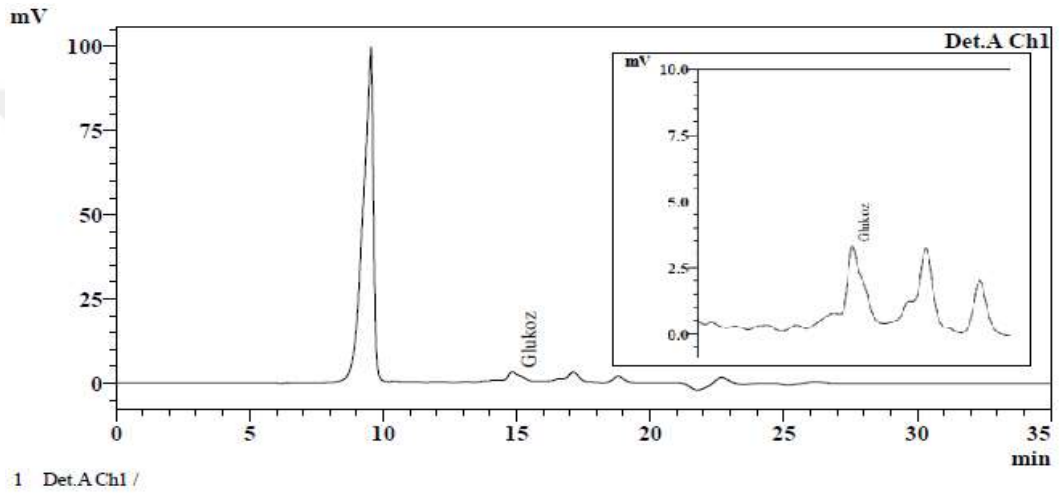
Şekil 14. *Lb. paracasei* WPS-11 tarafından üretilen EPS'in HPLC kromatogramı.



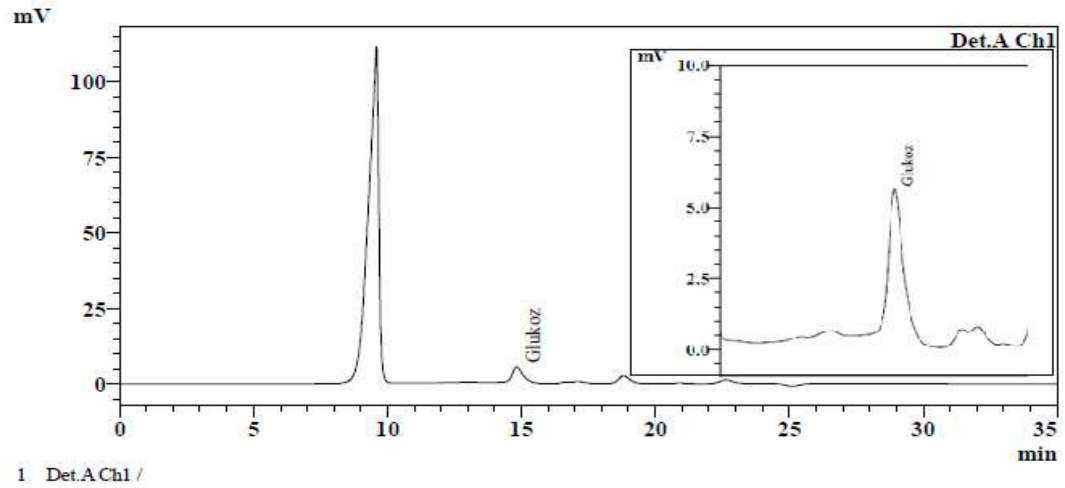
Şekil 15. *P. pentasaceus* WPS-8 tarafından üretilen EPS'in HPLC kromatogramı.



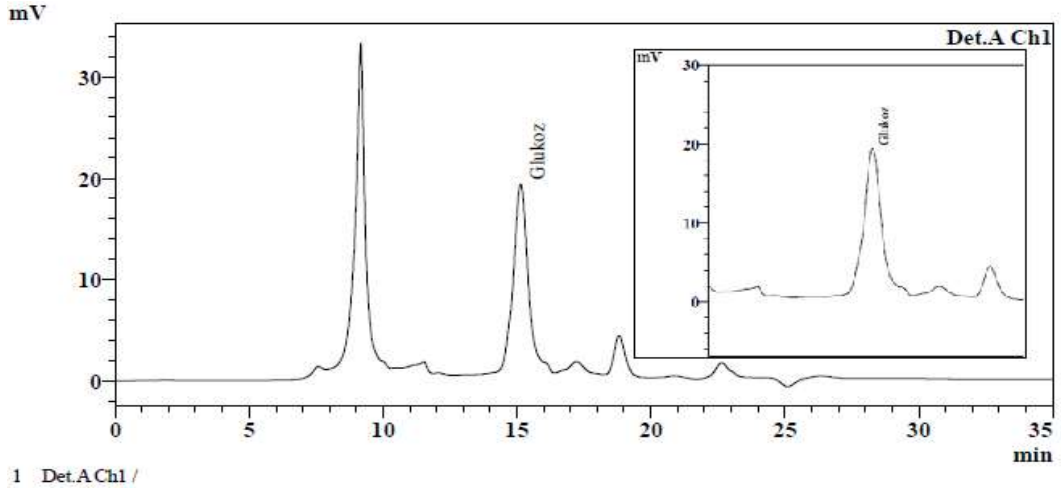
Şekil 16. *Lc. garvieae* WPS-3 tarafından üretilen EPS' in HPLC kromatogramı.



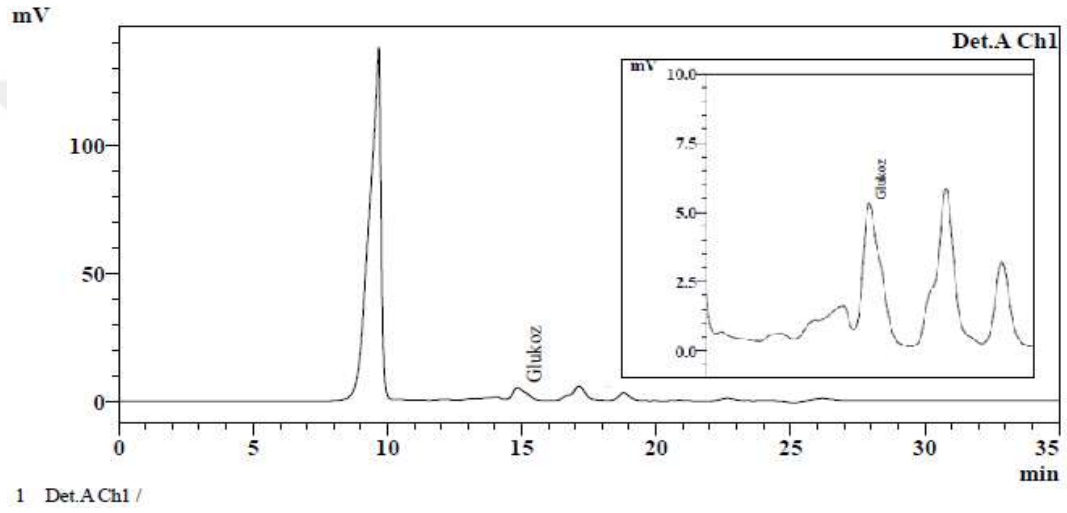
Şekil 17. *Lb. graminis* WPS-1 tarafından üretilen EPS' in HPLC kromatogramı.



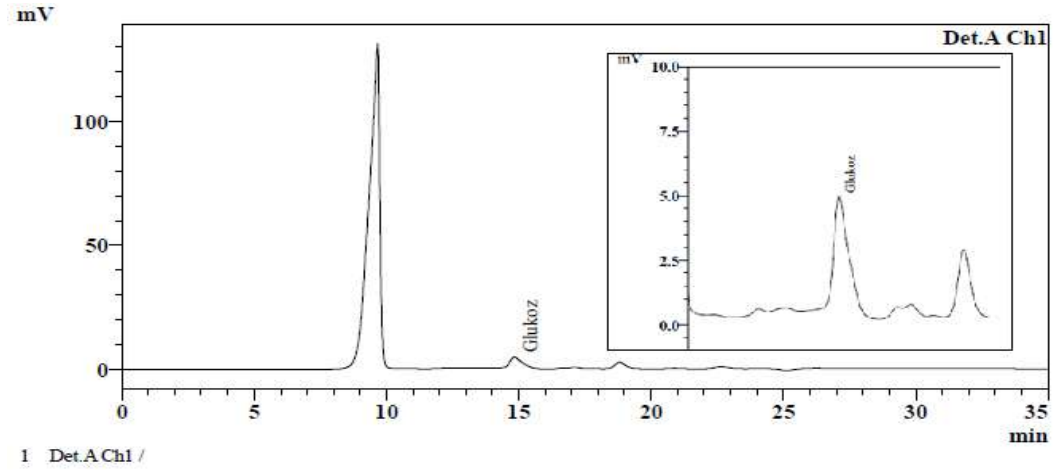
Şekil 18. *Lb. fermentum* C-9C tarafından üretilen EPS' in HPLC kromatogramı.



Şekil 19. *Lb. rhamnosus* C-9A tarafından üretilen EPS' in HPLC kromatogramı.



Şekil 20. *Lb. paracasei* C-7B tarafından üretilen EPS' in HPLC kromatogramı.



Şekil 21. *Lb. plantarum* C-6A tarafından üretilen EPS' in HPLC kromatogramı.

Elde edilen bulgulara göre test edilen ekşi hamur ve bebek dışkısı izolatlarının hepsinde glukoz monomeri tespit edilmiştir. Ek olarak bazı kromatogramlarda mevcut analizlerde tespit edilemeyen şeker monomerlerinin de olabileceği gözlemlenmiştir. Bununla birlikte *Lb. fermentum* C-9C ve *Lb. rhamnosus* C-9A suşları glukozdan oluşan EPS üretmiştir. Bu EPS'lerde

yapısal karakterizasyon çalışmaları devam etmektedir. Ekşi hamur kaynaklı LAB'da glukun üretimi yaygınlık göstermekte olup Bounaix vd. (2009); (Di Cagno vd., 2006) yapmış oldukları çalışmalarda seçtikleri *W. cibaria*, *Lb. plantarum* ve *P. pentosaceus* suşlarının glukun yapıları EPS ürettiklerini tespit ederek bu bilgiyi desteklemişlerdir. Bazı araştırmacılar da glukun üretme kabiliyetlerinin *Lactobacillus* cinslerinde yaygın olarak görüldüğünü öne sürmüşlerdir (Van Geel-Schutten, Fleisch, Ten Brink, Smith, & Dijkhuizen, 1998).

Ekşi hamurdan izole edilen suşların tümünün Modifiye sükrözlu BHI ortamında gelişimine bağlı olarak EPS üretimini gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular tüm suşların EPS ürettiği yönündedir. Çalışma çerçevesinde elde edilen sonuçlar ile Bounaix vd. (2009) yapmış olduğu çalışmadaki EPS üretim sonuçları benzerlik göstermektedir. Galle, & Arendt (2014)'e göre, ekşi hamur bazlı ekmeklerin raf ömrünün uzun olmasının temel sebebi LAB tarafından üretilen metabolitlerle ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir. Üretilen metabolitler (organik asitler, ekzopolisakkarit) fermantasyonda aktif rol oynayarak ekmeğin kalitesini geliştirmektedirler. Ortamdaki sükrözden glukansukraz aktivitesi ile oluşan EPS, hamurun viskoelastik özelliği ve nişasta retrogradasyonunu etkileyerek ekmeğin dokusunu olumlu yönde etkilediğine dair bilgiler öne sürülmüştür. Benzer olarak Di Cagno vd. (2006) yapmış oldukları çalışmada, karbon kaynağı olarak sükröz kullandıklarında ekşi hamur kaynaklı laktik asit bakterilerinin (*Lb. plantarum*, *W. cibaria*, *P. pentosaceus*) iki tip homopolisakkarit glukun ve fruktan sentezlediklerini rapor etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise, bağırsak ve tahıl bazlı üründen izole edilen 100'den fazla laktik asit bakterilerinde sükrözden EPS üretimi taranmış ve test edilen suşlardan 15'inin fruktan, dördünün ise glukun ürettiği tespit edilmiştir (Tieking, Korakli, Ehrmann, Gänzle, & Vogel, 2003).

Bilindiği üzere ekzopolisakkaritler, immün-stimülatör gibi bağışıklığı uyarıcı (G. Vinderola, Perdigon, Duarte, Farnworth, & Matar, 2006), antitümoral etki (Nishimura, 2014) ve kandaki kolesterol seviyesinin düşürülmesinde rol aldığından dolayı sağlık üzerinde olumlu etkiler gösteren mikrobiyaller olarak tanımlanmaktadır (Ryan, Ross, Fitzgerald, Caplice, & Stanton, 2015). Buna benzer çeşitli çalışmalarda LAB tarafından üretilen EPS'in, adhezyon ve biyofilm oluşturma ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (De Vuyst, & Degeest, 1999; Klein vd., 2009).

Şentürk, Dertli, Erten, & Şimşek (2020), tarhanadan izole edilen *Lb. plantarum* suşlarının (PFC 309, PFC 310, PFC 312 ve PFC 313) şeker gruplarının incelemesi sonucu, izolatların bir kısmı glukoz ve galaktoz üretimi gerçekleştirdiğini tespit ederken, bir kısmının ise (PFC308 ve PFC 311) glukoz, galaktoz ve fruktozdan oluştuğunu tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise, test edilen tüm suşların glukoz ünitelerinden oluştuğu tespit edilmiştir.

İspirli, & Dertli (2018), Bayburt'tan topladıkları geleneksel ev tipi, farklı yerlerden 21 tane yoğurt örneği toplamış ve toplam 150 izolattan *Lb. bulgaricus* (4), *S. thermophilus* (9), *Leuc. mesenteroides* (2) ve *Lb. plantarum* (6) olmak üzere 21 tane suşun genotipik olarak ayrımı sağlanmıştır. Akabinde bu suşlardan en sümüksü suşlar seçerek EPS üretimlerine bakmışlardır. Daha sonra monosakkarit kompozisyonuna HPLC analizi ile incelenmiş ve çalışma sonunda *Lb. plantarum* Y36 suşunun homopolimerik tipi glukun ürettiğini tespit etmişlerdir.

Genel itibarıyla elde edilen sonuçlar doğrultusunda ekşi hamur ve bebek dışkısı kaynaklı LAB türlerinin EPS ürettikleri tespit edilmiştir. Genellikle ekşi hamur bazlı LAB türlerinin glukun ve fruktan tipi EPS üretimi gerçekleştirdiği edinilen bilgiler arasında yer almaktadır (Bounaix vd., 2009). *Lactobacillus* cinslerinin bazıları hücre yüzeyi özelliklerinin belirlenmesinde önemli derecede rol alan EPS üretme kabiliyetine sahiptirler (Lebeer vd., 2008). Ayrıca üretilen EPS biyofilm oluşumunda da rol aldıkları için kolonizasyonu da arttırabilmektedir (Branda, Vik, Friedman, & Kolter, 2005; Vu, Chen, Crawford, & Ivanova, 2009). Bunun yanı sıra da LAB'ın ürettiği EPS'in prebiyotik etki göstererek LAB türlerinin gelişimini teşvik ettiği düşünülmektedir.

DNS Metodu ile Belirlenen EPS Üretim Miktarı

Probiyotik LAB suşunun belirlenmesi açısından EPS üretimi büyük önem taşımaktadır. EPS üretme kabiliyetlerinin yanı sıra üretim miktarları da katıldığı gıdaya fonksiyonellik kazandırması bakımından tercih edilme sebebi olabilmektedir. Bu kapsam da test edilen *Lb. graminis* WPS-1, *Lb. paracasei* C-7B, *Lb. rhamnosus* C-9A, *Lb. paracasei* WPS-11, *Lb. plantarum* C-6A, *Lc. garvieae* WPS-3, *Lb. plantarum* WPS-12, *Lb. fermentum* C-9C ve *P. pentosaceus* WPS-8 suşları, MSBHI (Modifiye Sükrozlu Beyin Kalp İnfüzyonu) ortamında 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılarak EPS üretim kabiliyetleri test edilmiş olup sonuçlar Tablo 12'de verilmiştir.

Ekzopolisakaritler (EPS) fermente ürünlerin reolojisinde ve dokusunda önemli bir rol oynamaktadır. Farklı LAB türleri çok çeşitli EPS üretmekte olup ticari üretilen EPS'lere kıyasla 40-800 mg/L gibi düşük EPS üretimi gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Boels vd., 2003). Yapılan bir çalışmada, Ekzopolisakarit üretimi üç laktobasil suşu arasında karşılaştırılmıştır. Çalışma sonunda *Lb. rhamnosus* 'un iki suşu için EPS üretiminin *Lb. paracasei*'den daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Süt ortamında karbon kaynağı olarak laktoz kullanmışlar ve 36 saatin sonunda EPS üretim miktarlarının *Lb. paracasei* Tip V 79 mg/L'ye ulaştığını, *Lb. rhamnosus* suşlarının ise 280 mg/L'den fazla ürettiği tespit edilmişlerdir (Dupont, Roy, & Lapointe, 2000). Sonuç olarak EPS üretiminde kültür ortamının ve karbon kaynağının büyük öneme sahip olduğu

görülmektedir. Yapılan tez çalışmasında ise, MsBHI ortamı kullanılmış olup karbon kaynağı olarak sukroz seçilmiştir. Bu şekilde EPS üretim miktarları $314-442 \mu\text{g}/10^7 \text{ kob}$ arasında değiştiği tespit edilmiştir.

Tablo 12. MSBHI Ortamında Geliştirilen LAB Suşlarının EPS Üretim Seviyeleri

Örnek kodu	EPS Üretim Miktarı ($\mu\text{g}/10^7 \text{ kob}$)
WPS-1	442 ± 0.02
C-7B	382 ± 0
C-9A	391 ± 0.01
WPS-11	394 ± 0.01
C-6A	333 ± 0.03
WPS-3	314 ± 0.02
WPS-12	425 ± 0.02
C-9C	367 ± 0.03
WPS-8	334 ± 0.03

*Her değer üç verinin ortalamasını ifade etmektedir (\pm STD)



Şekil 22. LAB suşları tarafından üretilen EPS'in üretim miktarlarının karşılaştırılması.

Şekil 22'den görüldüğü üzere test edilen LAB türlerinin EPS üretim miktarları birbirine yakın bulunmuştur. En yüksek EPS üretimi *Lb. graminis* WPS-1 suşunda görülürken, bu suşu *Lb. plantarum* WPS-12, *Lb. rhamnosus* C-9A ve *Lb. paracasei* WPS-12 suşları takip etmektedir.

Yapılan bir çalışmada, çeşitli fermente gıdalardan izole edilen *Lactobacillus*, *Weissella* ve *Pediococcus* cinslerinin EPS üretimleri araştırılmıştır. Analiz sonucunda EPS üretimleri $250-960 \text{ mg/L}$ (ort. 507.05 mg/L) olmuştur. Analiz kapsamında inceledikleri *Lb. fermentum* suşlarının $250-600 \text{ mg/L}$ arasında EPS ürettiklerini tespit ederken, *Lb. plantarum* suşlarının $390-960 \text{ mg/L}$ arasında EPS ürettiklerini tespit etmişlerdir (Patel, Prajapati, Holst, & Ljungh, 2014). Yapılan bu çalışmada ise, LAB suşlarının EPS üretim miktarları $314-442 \mu\text{g}/10^7 \text{ kob}$ (ort. $378 \mu\text{g}/10^7 \text{ kob}$) olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca *Lb. fermentum* C-9C, *Lb. plantarum* WPS-

12 ve *Lb. plantarum* C-6A suşlarında EPS miktarları da sırasıyla 367 µg/10⁷ kob, 425 µg/10⁷ kob ve 333 µg/10⁷ kob olarak saptanmıştır.

Smitinont *vd.* (1999) yapmış oldukları çalışmada Tayland fermente gıdasından yüz dört izolat elde etmiştir. Bu izolatların EPS üretimi için dört farklı karbon kaynağı kullanılmış çalışma sonunda sadece yedi izolatın EPS ürettiği ve bunların ise sükrözden üretildiği tespit etmişlerdir. Dikkat çeken husus ise sıvı ortamda iki izolatın 0.1 g/L'den daha fazla EPS üretmesi olmuştur. Bu suşlar sırasıyla *P. pentosaceus* AP-1 (6 g/L) ve *Pediococcus pentosaceus* AP-3 (2.5 g/L) olduğunu belirtmiştir. Bizim çalışmamızda ise, *P. pentosaceus* WPS-8 suşunun EPS üretim miktarı 334 µg/10⁷ kob olup bu çalışmaya kıyasla, belirtilen iki izolattan düşük miktarda EPS ürettiği, diğer izolatlardan ise yüksek miktarda EPS ürettiği saptanmıştır.

Yapılan başka bir çalışmada, 4-15 günlük çocukların dışkılarından 20 tane laktobasil izole edilerek EPS üretim miktarları araştırılmıştır. Suşların EPS üretim miktarları 70-290 mg/L arasında değişmiştir. Test edilen suşlar arasında *Lb. fermentum* T16-T18-T20, *Lb. plantarum* T14-T15-T21, *Lb. paracasei* T4-T5 suşları bulunmakta olup (Tulumoglu *vd.*, 2013), bizim çalışmamızda ise bebek dışkılarından izole edilen *Lb. fermentum* C-9C, *Lb. plantarum* C-6A, *Lb. paracasei* C-7B suşları yer almaktadır. Yaptığımız çalışmamızda, bu suşların EPS üretim miktarları 333-382 µg/10⁷ kob arasında değiştiği tespit edilmiştir.

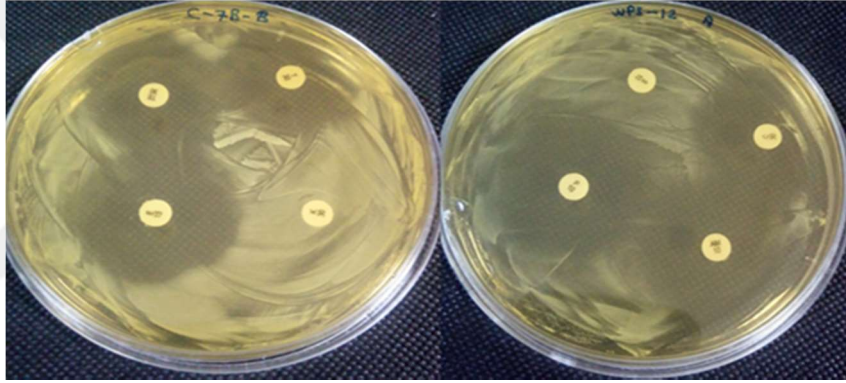
Van Geel-Schutten *vd.* (1998) yapmış oldukları çalışmada, toplam 182 *Lactobacillus* suşlarının yüksek şeker (sakkaroz ya da rafinoz) konsantrasyonuna sahip sıvı ortamda EPS üretimini araştırmıştır. Çalışma sonunda 60 pozitif suş elde edilmiş olup bu suşların 17'sinin 100 mg/L'den daha fazla EPS üretmiş olduğu belirlenmiştir. Sükrözün ise EPS sentezinde çok iyi bir substrat olduğunu da vurgulamışlardır. Yine başka bir çalışmada ise Feng, Chen, Li, Nurgul, & Dong (2012), 13 tane geleneksel fermente gıdadan toplam 148 LAB suşu izole etmişlerdir. İzolatların çoğununun EPS ürettikleri belirlenmiş ancak *Lb. plantarum* 70810 (HQ259238) EPS üretim kapasitesinin diğerlerine oranla bir hayli yüksek bulmuşlardır (0.859 g/L). Sonuç olarak EPS üretimleri bakteri türü hatta suşuna, geliştirilen kültür ortamına, karbon kaynağına, izolasyon kaynağı gibi faktörlere bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir.

Doğan (2017) yaptığı tez çalışması kapsamında, Türkiye'nin farklı bölgelerinden fermente ürünler toplanmış ve izole edilen türlerin probiyotik potansiyelini araştırmıştır. Elde ettiği izolatların EPS üretim miktarı değerlendirildiğinde kefirde izole ettiği *Lb. plantarum* 44C-74C-12C suşlarından sırasıyla 34.52 mg/L, 123.1 mg/L ve 41.05 mg/L EPS elde ettiğini rapor etmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise, ekşi hamurdan izole edilen *Lb. plantarum* WPS-12 suşunun 425 µg/10⁷ kob EPS ürettiği tespit edilmiştir. Yapılan çalışmaya kıyasla bizim

çalışmamızda ki EPS üretim miktarının fazla olmasının sebebi izolat kaynağının farklı olması ve suş bazında farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Antibiyotik Hassasiyetinin Belirlenmesi

Probiyotik LAB türü seçiminde en büyük risk faktörlerinden birisi antibiyotik direnç genlerinin bakteriler arasında aktarma potansiyelidir. Tez çerçevesinde Streptomycin (S) 10 µg, Penicillin G (P) 10 units, Kanamycin (K) 30 µg, Chlomphenicol (C) 30 µg, Erythromycin (E) 15 µg, Tetracycline (TE) 30 µg, Oxytetracycline (T) 30 µg ve Ampicillin (AM) 10 µg gibi farklı antibiyotiklerin, test edilen LAB suşları üzerine inhibisyon etkisi disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. 37°C'de 24 saatlik inkübasyonun sonunda kullanılan antibiyotik disklerinin etrafında oluşan zon çapları mm cinsinden hesaplanarak sonuçlar Tablo 13'de verilmiştir. *Lb. paracasei* C-7B ve *Lb. plantarum* WPS-12 suşlarının test edilen antibiyotik disklerine karşı duyarlılık Şekil 23'de verilmiştir.



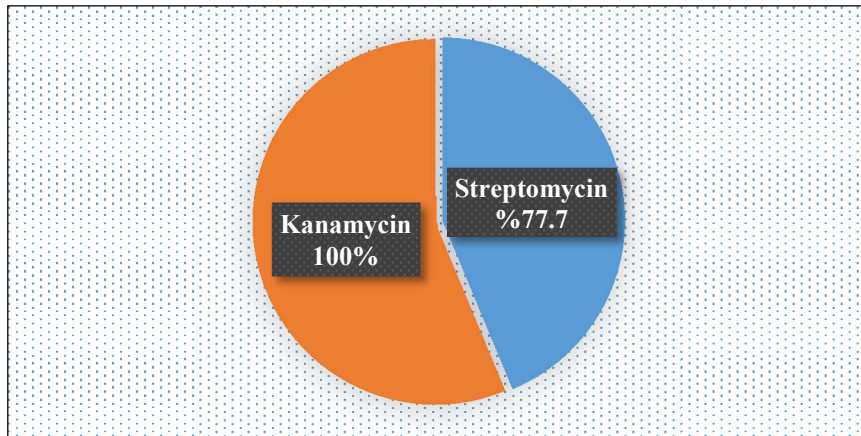
Şekil 23. *Lb. paracasei* C-7B ve *Lb. plantarum* WPS-12 suşlarının disk difüzyon yöntemi ile belirlenen antibiyotik hassasiyeti.

Tablo 13. LAB Suşlarının Antibiyotik Profilleri

	S	P	K	C	E	TE	T	AM
C-9A	2.0 ± 0.1	10.0 ± 0.1	-	11.0 ± 0	10.0 ± 0.1	9.0 ± 0.1	12.0 ± 0.1	9.0 ± 0
WPS-12	-	13.0 ± 0	-	12.0 ± 0.1	10.0 ± 0	14.0 ± 0.1	6.0 ± 0.1	13.0 ± 0.1
C-9C	-	13.0 ± 0.1	-	11.0 ± 0.1	9.0 ± 0.1	7.0 ± 0.1	7.0 ± 0.1	15.0 ± 0.1
C-6A	-	10.0 ± 0.1	-	8.0 ± 0.1	9.0 ± 0	5.0 ± 0.1	8.0 ± 0.1	15.0 ± 0
C-7B	-	20.0 ± 0.1	-	12.0 ± 0.1	11.0 ± 0.1	11.0 ± 0	10.0 ± 0.1	16.0 ± 0.1
WPS-1	-	15.0 ± 0.1	-	10.0 ± 0.1	13.0 ± 0.1	9.0 ± 0	10.0 ± 0.1	12.0 ± 0.1
WPS-3	-	16.0 ± 0	-	15.0 ± 0.1	14.0 ± 0.1	11.0 ± 0.1	14.0 ± 0.1	12.0 ± 0.1
WPS-8	5.0 ± 0.1	10.0 ± 0.1	-	13.0 ± 0.1	11.0 ± 0	4.0 ± 0.1	6.0 ± 0.1	8.0 ± 0.1
WPS-11	-	11.0 ± 0	-	16.0 ± 0.1	12.0 ± 0.1	9.0 ± 0.1	9.0 ± 0.1	16.0 ± 0.1

Değerler mm cinsindedir. S, streptomycin; P, penicillin G; K, kanamycin; C, chloramphenicol; E, erythromycin; TE, tetracycline; T, oxytetracycline; AM, ampicillin. -, zon yok. Veri iki ölçümün ortalaması ± standart sapma (n = 2).

Bu çalışmada ekşi hamur ve bebek dışkısından izole edilen LAB suşlarının; streptomycin, penicillin G, kanamycin, chloramphenicol, erythromycin, tetracycline, oxytetracycline, ampicillin antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları test edilmiştir. Analiz sonucunda ise, test edilen tüm suşların kanamycin karşı direçli olduğu belirlenirken, *Lb. rhamnosus* C-9A ve *P. pentosaceus* WPS-8 suşları dışındaki tüm suşların streptomycine karşı dirençli oldukları belirlenmiştir (Şekil 24).



Şekil 24. Suşların antibiyotik disklerine karşı gösterdiği dirençlilik oranları.

Charteris vd. (1998) insan ve süt orjinli 46 *Lactobacillus* türü izole ederek 44 antibiyotiğe karşı hassasiyetini belirlemişlerdir. Bu kapsamda suşların tamamının, hücre duvarı sentezi inhibitörü olan cefoxitin ve aztreonam, protein sentezi inhibitörü olan amikacin, gentamicin, kanamycin ve streptomycin, nükleik asit sentezi inhibitörü olan norfloxacin, nalidixic asit, trimetoprim, ko-trimoksazol ve metronidazol, sitoplazmik membran fonksiyonu

inhibitörü olan polymyxin ve kolistin sülfat da dahil olmak üzere 14 antibiyotiğe karşı direçli olduğunu bunlardan başka, tetracycline, chloramphenicol ve rifampicine karşı da duyarlı oldukları tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmada olduğu gibi bizim çalışmada da, tüm suşların streptomycin (*Lb. rhamnosus* C-9A ve *P. pentosaceus* WPS-8 hariç) ve kanamycine dirençlilik gösterdiği, tetracycline ve chloramphenicol karşı tüm LAB suşlarının duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Tetracycline karşı en yüksek hassasiyeti *Lb. plantarum* WPS-12 suşu gösterirken, chloramphenicol karşı da en yüksek hassasiyeti *Lb. paracasei* WPS-11 suşu göstermiştir. Bebek dışkısu kaynaklı suşların bahsi geçen antibiyotiklere karşı direçlilik göstermesinin nedeni ise annenin hamilelik sürecinde antibiyotik tedavisi görmüş olabileceği ihtimali ile açıklanabilir.

Yapılan başka bir çalışmada Mısır'ın farklı bölgelerinden süt ve farmasötik ürünleri toplanarak toplam 244 LAB suşu izole edilmiştir. Elde edilen LAB izolatlarının antibiyotiklere duyarlılığı test edilmiştir. *Lactobacillus* suşları penicilline karşı %20.3, ampicilline karşı %1.4, streptomycine karşı %17.4, erytromycine karşı %58, tetracycline karşı %11.6, chloramphenicol karşı %36 dirençli olduğu bulunmuştur (Gad, Abdel-Hamid, & Farag, 2014). Yapılan çalışmada ise, test edilen LAB suşlarının tümü penicillin, ampicillin, erytromycine, , tetracycline ve chloramphenicol karşı hassasiyet gösterirken, *Lb. rhamnosus* C-9A ve *P. pentosaceus* WPS-8 suşları dışındaki diğer suşların tümü streptomycine karşı direnç göstermiştir.

Ashraf, & Smith (2016) probiyotik suşların karakterize edilmesinin sağlık açısından önemli olduğunu belirterek yaptıkları çalışmada 17 LAB suşunun antibiyotik toleransının belirlemişlerdir. Disk difüzyon yöntemi ile potansiyel probiyotik olan LAB suşlarının antibiyotik toleransının taranması sonucunda *Lb. rhamnosus* G5435'in içinde bulunduğu bütün suşların ampicillin ve erytromycine karşı duyarlı olduklarını belirlemişlerdir. Ayrıca test ettikleri türlerin vancomycin ve streptomycine karşı toleransının da yaygın olarak görüldüğüne dikkat çekmişlerdir. Bu bulgulara dayanarak toleransın antibiyotik tedavisi sonrası bağırsak mikrobiyotasında kolonizasyonun artırılması açısından suşlara fayda sağlayacağını da öne sürerek antibiyotik duyarlılığının potansiyel probiyotik bakterilerin seçiminde önemli olduğunu vurgulamışlardır (Ashraf, & Smith, 2016).

Arici, Bilgin, Sagdic, & Ozdemir (2004) yaptıkları araştırmada yeni doğan bebek dışkısuından 21 laktobasil türü izole etmişlerdir. Belirlenen *Lb. rhamnosus*, *Lb. paracasei*, *Lb. fermentum* *Lb. buchneri*, *Lactobacillus* spp *Lb. brevis* ve *Lb. curvatus* türlerinin antibiyotik dirençliliğini incelemişlerdir. Çalışma sonunda *Lb. rhamnosus* suşlarının (IF-1, IF-3, IF-4, IF-5, IF-6, IF-7) chloramphenicol, erytromycine, penicillin G (P) ve tetracycline karşı inhibisyon zon çapı sırasıyla 14-24 mm, 17-22 mm, 13-24 mm, 17-21 mm arasında belirlemişlerdir. *Lb.*

paracasei (IF-8, IF-9, IF-10, IF-11), suşlarının ise, chloramphenicol , erythromycine , penicillin G (P) ve tetracycline karşı inhibisyon zon çapı sırasıyla 18-21 mm, 19-22mm, 12-15 mm, 17-20 mm bulunmuş iken.. *Lb. fermentum* suşlarının (IF-12, IF-13, IF-14, IF-15), chloramphenicol, erythromycine, penicillin (P) ve karşı inhibisyon zon çapları sırasıyla 18-20 mm, 18-23 mm, 17-22 mm, 16-21 mm olduğunu belirlemilerdir. Bu tez çalışmasında ise, bebek dışkısı kaynaklı *Lb. rhamnosus* C-9A suşunun chloramphenicol (30µg), erythromycine (15µg), penicillin G (P), tetracycline (30ug) inhibisyon zon çapları sırasıyla 11mm, 10 mm, 10mm ve 9 mm olduğu, *Lb. paracasei* C-7B suşunun chloramphenicol (30µg), erythromycine (15µg), penicillin G (P) ve tetracycline (30ug)'e karşı inhibisyon zon çapı sırasıyla 12 mm, 11 mm, 20 mm, 11mm arasında olduğu ve son olarakta *Lb. fermentum* C-9C suşunun chloramphenicol (30µg), erythromycine (15µg), penicillin G (P) ve tetracycline (30ug)'e karşı inhibisyon zon çapları sırasıyla 11mm, 9 mm, 13 mm, 7 mm arasında olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan tüm suşların kanamycine karşı dirençli olması yapılan bu çalışma ile benzerlik göstermektedir. İzolat kaynağının aynı olması aynı özellik göstereceği anlamına gelmediği, suş bazında büyük farklılık görüldüğü yapılan çalışma ile gözlenmiştir.

Buna benzer bir çalışmada, yeni doğan bebekten izole edilen *Lb. reuteri* (3 suş), *Lb. gasseri* (3 suş), *Lb. acidophilus* (2 suş), *Lb. rhamnosus* (6 suş) ve *Lb. paracasei* (6 suş) türlerinin gastrointestinal sistemin spesifik koşullarına karşı dirençleri incelenmiştir. Bu kapsamda antibiyotik testinde *Lb. pacasei* suşlarının (DC411,DC412,DC414,DC415,DC416,DC417) penicillin, streptomycin tertracycline, chloramphenicol ve erythromycine karşı hassasiyet gösterdiği tespit edilirken *Lb. rhamnosus* suşlarının (DC424, DC425, DC426, DC427, DC428, DC429) penicillin, streptomycin tertracycline, chloramphenicol, erythromycine karşı hassasiyet gösterdiği tespit edilmiştir (Xanthopoulos vd., 2000). Bu çalışmada test edilen *Lb. paracasei* C-7B ve *Lb. rhamnosus* C-9A suşları penicillin G, tertracycline, chloramphenicol ve erythromycine karşı hassasiyet göstermiş iken, *Lb. rhamnosus* C-9A suşu hariç *Lb. paracasei* C-7B suşu streptomycine karşı direnç göstermiştir.

Tulumoglu vd. (2013) yaptıkları çalışmada 4-15 günlük çocukların dışkısından izole ettiği 20 laktobasil suşlarının 13 antibiyotiğe karşı duyarlılıkları araştırılmıştır. Antibiyotik direncinin, potansiyel probiyotik bakterileri tanımlamak için ön tarama olarak kabul edilebileceğini ifade ederek çalışmalarını bu yönde yapmışlardır. Elde ettiği sonuçlara göre, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum* türlerinin hepsinin tetracycline, penicillin G, erythromycin ve ampicilline karşı hassas olduklarını bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise, tetracycline, penicillin G, erythromycin ve ampicilline karşı, tüm suşların duyarlı oldukları tespit edilmiştir.

Anne sütü, fonksiyonel özelliklere sahip laktik asit bakterisi kaynağıdır. Aynı zamanda da potansiyel probiyotik kaynağı olarak da bilinmektedir. Bu konu ile ilgili yapılan bir çalışmada, anne sütünden yedi tane *Lb. rhamnosus* suşu izole edilerek probiyotik potansiyelleri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre suşların çoğu streptomycin, ampicillin, kanamycin ve penicilline karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir (Rajoka *vd.*, 2017). Yapılan bu çalışmada ise, yeni doğmuş bebek dışkısu kaynaklı *Lb. rhamnosus* C-9A suşunun, kanamycine dışındaki tüm antibiyotiklere karşı hassas olduğu tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara bakıldığında bu çalışmada araştırılan suşların çoğu streptomycine karşı yüksek direnç göstermesi ile chloramphenicol, penicillin G ve tetracycline karşı yüksek hassasiyet göstermesi, Wolupeck *vd.* (2017) yaptığı çalışma ile paralellik göstermektedir.

Antimikrobiyal Etkinin Belirlenmesi

Probiyotik olabilmek için en önemli kriterlerden bir tanesi de patojenik mikroorganizmaların gelişimlerini inhibe etme özelliğidir. Bu amaçla, *S. typhimurium* RSSK 95091 (P78), *E. coli* BC 1402 (P12), *B. cereus* BC 6830 (P60), *Y. enterocolitica* ATCC 27729 (P91) ve *S. aureus* ATCC 25923 (P94) adlı indikatör mikroorganizmalar kullanılarak, suşların antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Oluşan inhibisyon sonuçları Tablo 14’de verilmiş olup suşların çoğu indikatör mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Yalnızca *Lb. rhamnosus* C-9A ve *Lb. paracasei* WPS-11 suşlarının *S. typhimurium* türüne karşı antimikrobiyal etki göstermediği belirlenmiştir.

Tablo 14. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

	P-12	P-60	P-94	P-91	P-78
<i>Lb. paracasei</i> C-7B	++	+	+	+	+
<i>Lc. garviae</i> WPS-3	+	+	+	+	+
<i>Lb. rhamnosus</i> C-9A	+	+	+	+	-
<i>Lb. paracasei</i> WPS-11	+	+	+	+	-
<i>P. pentosaceus</i> WPS-8	+	+	+	+	+
<i>Lb. plantarum</i> C-6A	++	+	+	+	+
<i>Lb. fermentum</i> C-9C	++	+	+	++	+
<i>Lb. graminis</i> WPS-1	++	+	+	+	+
<i>Lb. plantarum</i> WPS-12	+	+	+	+	+

* +, inhibisyon çapı 1-3 mm; ++, inhibisyon çapı 3-5 mm; -, inhibisyon yok. P-12, *E. coli* BC 1402; P-60, *B. cereus* BC 6830; P-78, *S. typhimurium* RSSK 95091; P-91, *Y. enterocolitica* ATCC 27729; P-94, *S. aureus* ATCC 25923

Akepaer (2015) tez çalışması kapsamında, test ettiği *Pediococcus* cinslerinin *E. coli* ATCC 11229, *E. coli* O157:H7, *B. cereus* RSKK 863, *S. enteritidis* ATCC 13076, *S. aureus* ATCC 25923 bağırsak patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivitelerini belirlemiştir. *P.*

pentosaceus P19 ve C-24 suşları *B. cereus* türüne karşı inhibisyon zon çapı sırasıyla 4.0-4.8 mm olarak tespit etmişlerdir. Yapılan tez çalışmasında ise, *P. pentosaceus* WPS-8 suşunun *B. cereus* türüne karşı inhibisyon çapı 1-3 mm arasında olduğu gözlenmiştir.

Tulumoglu vd. (2013) çocukların dışkılarından izole ettiği 20 laktobasil suşunun *E. coli* ATCC 11229, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *S. aureus* ATCC 29213 indikatör mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmeyi amaçlamışlardır. Çalışma sonunda *E. coli* türüne karşı *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* ve *Lb. fermentum* türlerinin inhibisyon zon çapları sırasıyla 4.2 – 6.0 mm, 6.0-6.1 mm, 4.0 – 4.2 mm olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada ise, *Lb. paracasei* C-7B, *Lb. plantarum* C-6A ve *Lb. fermentum* C-9C suşlarının *E. coli* türüne karşı inhibisyon çaplarının 1-3 mm olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgulara benzer şekilde, Demirbaş vd. (2017) yayınlamış oldukları raporda LAB türlerinin bu patojen suşlarına karşı antimikrobiyel etkilerini tespit etmişlerdir.

Venkadesan, & Sumathi (2015)'in çalışmasında, fermente gıda ürünlerinde (lor, peynir, yoğurt) spesifik ortam hazırlanarak totalde 123 LAB suşu izole edilmiş ve *Lb. fermentum*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, *P. pentosaceus* tanımlanmıştır. İzolatların tamamının disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. *E. coli* türüne karşı *Lb. fermentum* 10.8 mm, *Lb. plantarum* 7.4 mm, *P. pentosaceus* 10.2 mm olduğunu bulmuşlardır. Yapılan tez çalışmasında ise, *E. coli* türüne karşı *Lb. plantarum* WPS-12 ve *P. pentosaceus* WPS-8 suşlarında 1-3 mm, *Lb. plantarum* C-6A ve *Lb. fermentum* C-9C suşlarında 3-5 mm aralığında inhibisyon tespit edilmiştir. *S. aureus* türüne karşı *Lb. fermentum* 11.6 mm, *Lb. plantarum* 8.2 mm ve 11.1 mm olduğu rapor edilirken bu çalışmada kullanılan suşların tümü 1-3 mm aralığında tespit edilmiştir.

Antifungal Aktivitenin Belirlenmesi

Birçok gıdanın tüketiminde küf oluşumu yaşanan başlıca sorunlardan bir tanesi olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle fırıncılık sektöründe ya da gıda kaynaklı fermente ürünlerin oluşumunda antifungal etki gösteren probiyotik potansiyeline sahip LAB türlerinin kullanımı biyo-korucuyu olarak önem arz etmektedir. Bu açıdan ekşi hamur kaynaklı LAB türlerinde antifungal etkinin gözlemlenmesi teknolojik gelişmeleri de beraberinde getirmektedir. Böylece gıda sektöründe fungal etkiyi durdurabilmek adına kullanılan ingredientlerin kullanımının durdurulması adına da adım atılmış olacaktır. Bu kapsamda ekşi hamur ve bebek dışkısı kaynak LAB suşlarının antifungal aktiviteleri *P. chrysogenum*, *B. cinerea*, *A. parasiticus*, *F. oxysogenum*, *A. niger* ve *A. alternata*' ya karşı test edilmiştir (Tablo 15). *A. niger*'e karşı *Lb. plantarum* C-6A suşunun antifungal etkiye sahip olduğu Şekil 25'de gösterilmiştir. Çalışma

sonunca test edilen türlerin çoğunlukla antifungal etkiye sahip olduğu anlaşılırken, *P. chrysogenum*'a karşı *Lb. graminis* WPS-1 ve *Lb. fermentum* C-9C suşlarının, *A. niger*'e karşı da *Lb. graminis* WPS-1 suşunun antifungal aktivite göstermediği tespit edilmiştir..



Şekil 25. *A. niger*'in *Lb. plantatum* C-6A suşuna karşı antifungal etkisi.

Genel itibariyle potansiyel probiyotik niteliği taşıyan LAB suşlarının, *F.oxyporum*, *P. chrysogenum*, *B. cinerea*, *A. parasiticus* ve *A. alternata* küf türlerine karşı bakteri kolonisi etrafında inhibisyonlu bölge açık bir şekilde tespit edilmiş olup, spor oluşumu güçlü oranda durdurduğu gözlemlenmiştir.

Tablo 15. LAB Türlerinin Antifungal Aktivite Sonuçları

	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Alternaria alternata</i>
WPS-1	++	-	-	+	++++	+
WPS-3	++++	+	++	++++	++++	++++
WPS-8	+++	+	+	+++	++++	+++
C-7B	++++	++	++	++++	++++	++++
C-6A	++++	++	+++	++++	++++	++++
C-9A	++++	+	++	++++	++++	++++
C-9C	++++	+	-	++++	++++	++++
WPS-11	++++	++	+	++++	++++	+
WPS-12	++++	++	++	++++	++++	++++

* (-)inhibisyon yok, (+) spor oluşumunu geciktirmesi, (++) bakteri kolonisi etrafında küçük inhibisyon bölgesi ile spor oluşumunu geciktirmesi, (+++) bakteri kolonisi etrafında iyi anlaşılır şeffaf bölge ile spor oluşumunu geciktirmesi, (++++) bakteri kolonisi etrafında geniş inhibisyon bölgesi ile misel büyümesini çok iyi engellemesi

Hassan, & Bullerman (2008), dört farklı ekşi hamurdan totalde 116 laktik asit bakterisi izole ederek bu bakterilerin antifungal aktivitelerini araştırmışlardır. Kültürlerin, *P. expansum* türüne karşı çok iyi etki gösterdiğini tespit ederken, *Lb. paracasei* L1 ve L2 suşlarının *A. niger* ve *A. paraciticus* karşısında tamamen inhibe olarak gelişemediğini tespit etmişlerdir. Yapılan

bu çalışmada ise, ekşi hamur kaynaklı *Lb. paracasei* WPS-11 suşu, *A. parasitus* ve *A. niger* küflerine karşı etki gösterek misel büyümesini durdurduğu tespit edilmiştir.

Demirbaş vd. (2017), ekşi hamurdan izole ettikleri LAB türlerinin antifungal aktivitelerini incelediği çalışmada, *Lb. plantarum* ED-1 suşunun *P. chrysogenum* ve *A. niger*'e karşı antifungal aktiviteleri değerlendirmişler ve suşun etrafında küçük açık şeffaf bölge ile spor oluşumunu geciktirdiğini (++) tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise, ekşi hamur bazlı *Lb. plantarum* WPS-12 suşunun *P. chrysogenum* ve *A. niger*'e karşı bahsi geçen *Lb. Plantarum* ED-1 ile aynı özellik (++) gösterdiği tespit edilmiştir.

Aflatoksin dünya çapında ciddi bir sorun olarak görülmektedir. Modern tarımda yüksek kaliteli ve mikotoksin içermeyen yem maddelerinin kullanması gerekmektedir (Gerbaldo, Barberis, Pascual, Dalcerro, & Barberis, 2012). Aflatoksin kontamine olduğu birçok üründe kalite düşüklüğüne sebep olmakla birlikte, sağlık açısından ciddi bir tehlike oluşturmaktadır. *Aspergillus* cinslerine ait birçok türler aflatoksin gibi zehirli fungal bileşikler üretme potansiyeline sahiptirler (Koç, Arpacı, Ak, Karataş, & Cotty, 2016). Gıdaların korunmasında kimyasal koruyucuların yerine mikroorganizmaların kullanımı son yıllarda ciddi oranda önem kazanmıştır. Bu bağlamda, LAB türleri gıdaların biyokorunmasında çeşitli antimikrobiyel bileşenler ürettiği bilinmektedir. Gerbaldo vd. (2012), *Lb. rhamnosus* L60 ve *Lb. fermentum* L23, organik asitler, hidrojen peroksit, bakteriyosin gibi ikincil metabolitlerin üreticileri olduğunu öne sürmüşler ve bu konuyla ilgili yaptıkları çalışmada, *Aspergillus section Flavi* suşları ile laktobasil suşlarının birlikte kültüre ederek antifungal aktivitelerini belirlemişlerdir. Çalışma sonunda, hem *Lb. rhamnosus* L60, hem de *Lb. fermentum* L23 suşunun, tüm aflatoksijenik suşların gelişimini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca Aflatoksin B1 üretimini de *Lb. rhamnosus* L60 suşu ile %95.7-99.8, *Lb. fermentum* L23 suşu ile de %27.5-100 oranında azaldığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmada ise, *Lb. graminis* WPS-1, hariç diğer tüm suşların *Aspergillus* cinsinin üyeleri olan *A. niger* türlerine karşı koloni etrafında küçük inhibisyon bölgesi ile spor oluşumunu geciktirdiği gözlemlenirken ve *A. parasiticus* türlerini karşı misel büyümelerini engelleyerek spor oluşumunu yok etmesi ile de çok iyi fungusidal etki gösterdiği sonucu elde edilmiştir. Bu durumdan yola çıkarak, tez kapsamında incelenen potansiyel probiyotik olarak varsayılan LAB suşlarının, yem kontaminantları üzerine iyi bir antifungal özellik göstereceği düşünülmektedir.

Hücre Yüzeyi Hidrofobikliği Testi

Bağırsakta peristaltik hareketler sonucu, potansiyel probiyotik mikroorganizmaların kayıp gitmemesi için epitelyal yüzeylere yapışarak kolonize olmaları gerekmektedir. Bu sayede

kolona yapışan probiyotikler ortamı domine ederek patojenlerin kolonizasyonu önlemektedirler (Fuller, 1989). Bu nedenle probiyotiklerin seçiminde hücre yüzeyi hidrofobisitesi önemli kriterlerden bir tanesi olarak değerlendirilmektedir. Bakterilerin dış hücre yüzeyini incelemek adına sıvı hidrokarbonlar kullanarak bu hücrelerin afinitesi ile ilgili basit bir kantitatif yöntem tarif edilmiştir (Rosenberg, Gutnick, & Rosenberg, 1980). Bu kapsamda, yapılan çalışmada test edilen LAB'ların n-hexadecane hidrokarbonuna karşı mikrobiyal adezyonu araştırılmıştır. Hücre yüzeyi hidrofobikliği, bakteri hücresine bağlı olarak oldukça değişkenlik gösterdiği tespit edilmekle beraber referans suş *Lb. rhamnosus* GG (LGG) %13.7'lik hidrofobikliğe sahip olmuştur.

Hidrokarbonlara mikrobiyal yapışma (Microbial adhesion to hydrocarbons- MATH), genellikle mikroorganizmaların hücre yüzeyi hidrofobikliğinin bir ölçüsü olarak kabul edilmektedir. Epitel yüzeylere mikrobiyal yapışma işlemi, probiyotik LAB suşlarının membran yüzeyinin bileşimine bağlı karmaşık bir süreci nitelendirmektedir. Bu davranış hedef alınan yüzeyde elektrostatik ve Van der Waals etkileşimlerinin dengesine bağlıdır. Bu sebeple elektrostatik etkileşimler, mikroorganizmaların hidrokarbonlara yapışmasında büyük rol oynayabilir. Hidrokarbonlara iyi yapışan suşlar, "hidrofobik" zayıf yapışan suşlar "hidrofilik" olarak kabul edilmektedir (Busscher, Van de Belt-Gritter, & Van der Mei, 1995).

Ekşi hamur ve bebek dışkısından izole edilen LAB suşlarının potansiyel probiyotik niteliğinin belirlenmesi için önemli analizlerden biri olan tutunma testi bütün LAB suşlarına karşı uygulanarak, referans probiyotik kültür olan *Lb. rhamnosus* GG (LGG) karşı durum değerlendirilmesi için kullanılmıştır. Elde edilen suşların izolat kaynaklarına göre tutunum değerlendirmesi Şekil 26'da verilmişken, n-hexadecane hidrokarbonuna tutunmaları, yüzde olarak hesaplanmış olup elde edilen sonuçlar Tablo 16'da verilmiştir. Genel itibarıyla sonuçlar değerlendirildiğinde %3.0-81.2 arasında yüksek afinite göstermeleri, immün sistem üzerinde umut verici bir durum olarak görülmektedir. Bu durum hidrokarbona karşı yüksek düzeyde ilgisi olan suşların yüzey yapılarının kompleks olduğu sonucunu ortaya çıkarmaktadır.

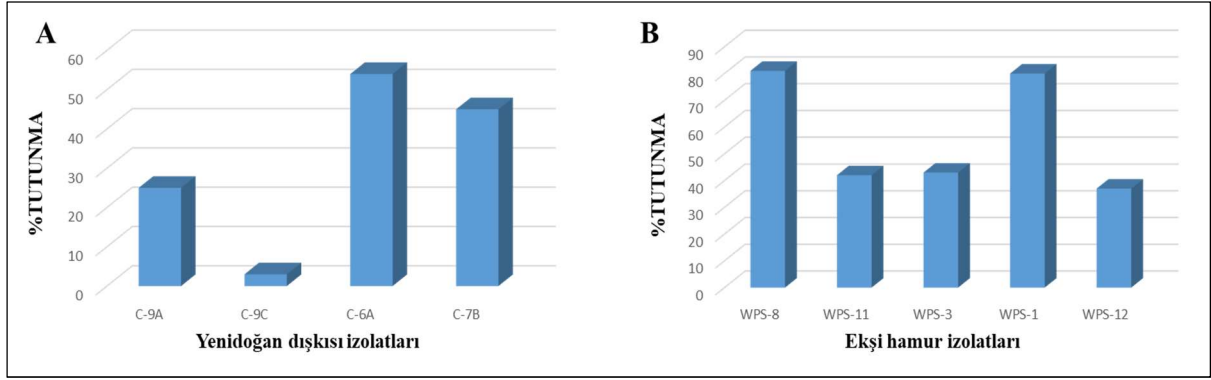
Tablo 16. LAB Suşlarının n-hexadecane Karşı % Tutunmaları

Suş Kodu	n-hexadecane
LGG ^a	13.7 ± 0.16
WPS-8	81.2 ± 0.10
WPS-11	42.9 ± 4.84
WPS-3	43.7 ± 9.19
WPS-1	80.1 ± 5.53
C-9A	25.8 ± 3.08
C-7B	45.1 ± 9.16
C-6A	54.1 ± 3,91
C-9C	3.0 ± 2.86
WPS-12	37.3 ± 5.01

(Değerler % tutunma değerleridir. Veriler üç ölçümün ortalaması olup standart sapmaları değerlerin yanında verilmektedir. Spektrofotometrede okunan değerler dikkate alınarak %hidrofobisite hesaplanmıştır) a; referans suş (*L.rhamnosus* GG)

Tablo 16'dan görüldüğü üzere, çözücüye karşı *P. pentosaceus* WPS-8 ve *Lb. graminis* WPS-1 suşlarının tutunma yüzdeleri %81.2 ve %80.1 olarak belirlenmiştir. Yapılan analiz sonucunda ekşi hamur kaynaklı bu iki suşun tutunma kapasitesinin diğer suşlara göre daha iyi olduğundan dolayı potansiyel probiyotik niteliği taşıdığı düşünülebilmektedir. Sharma, Sharma, & Sharma (2016), Kuzeybatı Himalayanların fermente süt ürünlerini, ticari uygulamalarda kullanılabilecek, zengin probiyotik potansiyeline sahip izolat kaynağı olduğunu belirleyerek fermente süt ürünlerinden iki tane LAB suşu izole etmiştir. *P. acidilactici* KM0 (KX671557) ve *Lb. casei* KL14 (KX774469) suşlarının, düşük pH toleransı, otoagregasyon, hücre yüzeyi hidrofobikliğini test etmiştir. Potansiyel probiyotik hücrelerin o-ksilen, kloroform ve etil asetata karşı hidrofobikliğinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi sonucunda, *P. acidilactici* KM0, o-ksilene %80, kloroforma %20 ve etil asetata karşı %30 tutunma gösterdiğini gözlemlemiştir. Bu çalışmada ise, *P. pentosaceus* WPS-8 suşu n-hexadecane karşı %81.2 adhezyon tespit edilmiştir. Her ne kadar suş bazında farklılık görülse de, aynı cinslerin farklı hidrokarbonlara karşı tutunmalarında benzerlik görülmüştür. Bu sonucu desteklemek adına ilerleyen çalışmalarda, *P. pentosaceus* WPS-8 suşunun o-ksilen ve diğer iki hidrokarbona karşı tutunma testi yapılabilir.

Archer, & Halami (2015) yaptığı bir çalışmada, insan dışkısı kaynaklı *Lb. fermentum* türlerinin probiyotik özellikleri araştırmıştır. Bu kapsamda *Lb. fermentum* 650, 511 ve MCC 2759 suşların hexadecane'e karşı %hidrofobistelerinin sırasıyla %2.22, %31.48 ve %41.31 olduklarını tespit etmiştir. Bu tez çalışmasında ise, dışkı kaynaklı *Lb. fermentum* C-9C suşunun hexadecane karşı hidrofobisitesi %3.0 olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmada da görüldüğü üzere aynı türlerde suş bazında önemli farklılıklar görülmüştür.



Şekil 26. Farklı kaynaklardan izole edilen suşların izolat kaynağı ve suşlara göre %tutunma dağılımları (A; Bebek dışkısı, B; Ekşi hamur kaynaklı suşların N-hexadecane hidrokarbonuna Tutunma yüzdeleri verilmektedir. WPS-8; *P.pentosaceus*, WPS-11; *Lb. paracasei*, WPS-3; *Lc. garvieae*, WPS-1; *Lb. graminis*, WPS-12; *Lb. plantarum*, C-9A; *Lb. rhamnosus*, C-7B; *Lb. paracasei*, C-6A; *Lb. plantarum*, C-9C; *Lb. fermentum*).

Ekşi hamur kaynaklı LAB türlerinin n-hexadecane çözücüsüne karşı tutunma yüzdeleri %37.3-81.2 arasında değişkenlik göstermektedir. Bu çözücüde en yüksek hidrofobik özelliğe *P. pentosaceus* WPS-8 suşu sahip olmakla beraber bu bakteriyi *Lb. graminis* WPS-1, *Lc. garvieae* WPS-3, *Lb. paracasei* WPS-11 ve *Lb. plantarum* WPS-12 suşları takip etmektedir.

Bu çalışmada, yenidoğan dışkısı kaynaklı LAB türlerinde en yüksek hidrofobikliği %54.1 *Lb. plantarum* C-6A suşu göstermiştir. Her iki izolasyon kaynağı karşılaştırıldığında, ekşi hamur bazlı LAB suşların daha yüksek hidrofobisite göstermesi dikkat çekmiştir. Sonuçlara bakılarak, bu tez çerçevesinde incelenen ekşi hamur suşlarının hidrofobisite yönünden potansiyel probiyotik olabileceği düşünülebilmektedir.

Geleneksel ekşi hamurdan, on altı LAB suşu izole edilen başka bir çalışmada, polar çözücü olarak n-hexadecane kullanılarak suşların hidrofobik özellikleri araştırılmıştır. Çalışma sonunda ise, *Lb. plantarum* H3a ve *Lb. plantarum* K3b suşlarının n-hexadecane karşı hidrofobikliği sırasıyla %43 ve %73 olarak tespit edilmiştir (Zangeneh, Khaleghi, & Khorrami, 2019). Bu çalışmada ise, ekşi hamur kaynaklı *Lb. plantarum* WPS-12 suşunun hidrofobisite değeri % 37.3 ile yapılan çalışmadan düşük bulunmuştur. Bu durum test edilen suşların, türleri aynı olmasına rağmen yapışma özelliklerinin farklı olması yüzey yapılarının kompleks olduğunu göstermektedir.

Kirjavainen vd. (1998), yeni doğan bebeklerden ve yetişkin bireylerin dışkı örneklerinde izolasyon yapmış ve probiyotik ürünlerdeki laktobasillerin çoğunun insan bağırsak mukozasına yapıştığını gözlemlemiştir. Bu çalışmalarının sonunda, *Lb. GG* %22-30, *Lb. paracasei* F19 %2 oranında adhezyon özelliği gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca suşların bazılarında,

bebek yaş gruplarına bağlı olarak önemli farklılıklarda gözlenmiştir. Bu tez çalışmasında ise, *Lb. paracasei* C-7B suşunun % 45.1 oranında adhezyon gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen bulgulara dayanarak probiyotik veya fonksiyonel gıda formülasyonlarında seçilen probiyotik suşun hedef yaş grubu açısından kritik önem taşıdığına dikkat edilmesi gerekmektedir.

Yapılan başka bir çalışmada Duary, Rajput, Batish, & Grover (2011) adlı araştırmacılar, manda sütü(1), peynir(1) ve insan dışkısı (5) olmak üzere üç farklı kaynaktan 7 *Lactobacillus* izolatu elde ederek, bu izolatların iki farklı hidrokarbona yapışma metodu ile suşların hidrofobikliğini değerlendirmişlerdir. Test edilen fekal izolatlardan olan *Lb. plantarum* Lp91 suşunun maksimum yüzde hidrofobikliği gösterdiğini tespit etmişlerdir (n-hexadecane; %35.73 ± 0,40). Diğer *Lb. plantarum* Lp72, *Lb. plantarum* Lp75, *Lb. plantarum* Lp77, *Lb. plantarum* Lp90 suşları ise sırasıyla %31.66, %27.40, %28.13, %25.06, %35.73 şeklinde hücre yüzeyi hidrofobikliği belirlenmiştir. Bu çalışma da ise, *Lb. plantarum* C-6A (yeni doğan dışkısı kaynaklı) %54.1, *Lb. plantarum* WPS-12 (ekşi hamur) suşu ise, %37.3 olarak tespit edilmiştir.

Benzer başka bir çalışmada ise, manda sütünden *Lb. plantarum* Lp9 suşu izole edilmiş ve bu suşun hidrofobikliği n-hexadecane karşı test edilerek, çalışma sonunda bu suşun hidrofobisitesinin %37.7 olduğu bildirilmiştir (Kaushik vd., 2009). Yapılan tez çalışmasında ise, *Lb. plantarum* WPS-12 suşunun %37.3 oranında hidrofobikliği, bu çalışmayla benzer bulunmuştur.

Angmo vd. (2016), Ladakh içeceğinden 25 LAB suşu izole ederek in vitro şartlar altında bu LAB suşlarının potansiyel probiyotik özelliklerini incelemişlerdir. Çalışma sonunda % hidrofobisiteyi sırasıyla *Lb. plantarum* 40,52,55,84 ve *Lb. fermentum* 72 izolatları sırasıyla %26.96, %38.90, %30.47, %35.74 ve %44.74 olarak tespit edilmiş iken yapılan bu çalışmada, *Lb. plantarum* WPS-12 ve C-6A suşlarının tutunmaları sırasıyla %37.3 ve %54.1 bulunmuştur.

Schillinger, Guigas, & Holzapfel (2005) yaptıkları *in vitro* çalışmada, probiyotik benzeri yoğurtlardan izole ettiği *Lactobacillus* suşlarının hücre yüzeyi hidrofobikliğini araştırmışlardır. Bu sebeple n-hexadecane çözücüsü kullanılmış ve çalışma sonunda *Lb. paracasei* BFE 688 suşunun %44, *Lb. paracasei* 742 suşunun %41 oranında hidrofobisite özellik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Yapılan tez çalışmasında ise, *Lb. paracasei* WPS-11 ve C-7B suşları n-hexadecane karşı sırasıyla %42.9 ve %45.1 oranında tutunum göstermiştir. Yapılan çalışma sonunda elde edilen veriler bu tez çalışmasını desteklemektedir.

Hücre yüzeyi hidrofobikliği, hidrokarbonlara yapışma kapasitesi ile sindirim sistemi boyunca epitelyuma yapışma yeteneğini belirlemektedir (Kos vd., 2003). Yapılan bir çalışmada, *Lb. acidophilus* L92'nin hidrofobik/hidrofilik hücre yüzeyi özelliğini değerlendirmek adına iki probiyotik (*Lb. plantarum* L4 ve *E. faecium* L3) MATH metoduna

göre karşılaştırması yapılmıştır. Analiz sonucunda ise bu araştırmacılar, *Lb. plantarum* L4 suşu, ksilene karşı %6.52, kloroforma karşı %47.03 ve etil asetata karşı %18.31'lik tutunma gösterdiğini tespit etmiştir. Ayrıca tüm suşların kloroforma karşı güçlü bir afinite özellik gösterdiği bildirilmiştir (Kos vd., 2003). Bu çalışmada ise, n-hexadecane çözücüne karşı *Lb. plantarum* suşları %37-54 oranındaki tespit ile edilmiştir. Çalışma kapsamında test edilen suşların n-hexadecane çözücüsüne karşı tutunma yüzdeleri ile bahsedilen çalışmadaki suşların kloroforma karşı tutunma yüzdeleri arasında benzerlik görülmektedir. Aynı türlerin farklı iki çözücüye olan ilginin benzerlik göstermesi merak uyandırmaktadır. İlerleyen aşamalarda test edilen suşların kloroforma olan ilgisi test edilebilir.

Seddik, Bendali, Cudennec, & Drider (2017) yaptıkları çalışmada Cezayir'in kuzeyinde bir şehir olan Benjaia hastanesinden bebek ve yetişkin dışkısından izole ettikleri 67 *Lactobacillus* izolatının, hücre yüzeyi özelliklerinin belirlenmesi adına otoagregasyon ve hidrofobikliği taranmıştır. İzolatlardan olan *Lb. plantarum* P251b1 ve *Lb. plantarum* P981b1 suşlarının %hidrofobisite oranları sırasıyla %51.33 ve %59.7 olarak belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada ise, *Lb. plantarum* WPS-12 ve C-6A suşlarının %hidrofobisite oranları %37-54 arasında değişmektedir. Hidrofobik özellik bu suşların aday probiyotik olabilirliği açısından önemli hale getirmektedir. Benzer olarak Vızoso Pinto vd. (2007), çocuk dışkısından izole ettiği *Lb. plantarum* ve *Lb. johnsonii* türlerinin *in vitro* olarak incelediği çalışmada, kontrol olarak *Lb. rhamnosus* GG suşu kullanılmış olup, test ettiği *Lb. plantarum* BFE1684, BFE 1685 suşları apolar çözücü olan n-hexadecane çözücüsü içinde sırasıyla %60.8 ile %67.6'lık tutunma gösterdiğini tespit ederken kontrol *Lb. rhamnosus* GG suşunun %18.5'lik tutunma gösterdiğini tespit etmiştir. Bu çalışmada ise, bebek dışkısından izole edilen *Lb. plantarum* C-6A suşu n-hexadecane karşı %54.1'lik adehesiv etki gösterirken kontrol olan *Lb. rhamnosus* GG %13.7'lik tutunma göstermiştir. Kısacası elde edilen bulgular yapılan çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Yapılan başka bir çalışmada, Kore'de sağlıklı bebek dışkısından izole edilen *Lactobacillus* sp. ve *Leuconostoc* sp. izolatlarının hidrofobik özellikleri araştırılmış ve çoğu suşun %90'ın üzerinde yüksek bir hidrofobisite (n-hexadecane) gösterdiği ortaya koyulmuştur. (Ji, Jang, & Kim, 2015). Bizim çalışma da ise bebek dışkısı kaynaklı *Lactobacillus* türlerinin %hidrofobisitesi en yüksek %54 bulunmuştur Tez kapsamında incelenen diğer bir izolasyon kaynağı olan ekşi hamur suşlarından, n-hexadecane karşı gösterilmiş en yüksek değer %81.2 ile *P. pentosaceus* WPS-8 suşu olmuştur. Bu durum fermente ürünlerden izole edilen LAB türlerinin hücre yüzeyi interaksiyonunda genetik açıdan farklılık olduğunu göstermektedir.

Tez kapsamında probiyotik özelliği araştırılan suşlardan biri (*L.fermentum* C-9C) önemsenmeyecek kadar düşük adhezyon gösterirken, beş suş (*Lc. garvieae* WPS-3, *Lb. rhamnosus* C-9A, *Lb. paracasei* C-7B, WPS-11 ve *Lb. plantarum* WPS-12) orta derecede, üç suş (*Lb. graminis* WPS-1, *P. pentosaceus* WPS-8 ve *Lb. plantarum* C-6A) güçlü adhesiv özellik göstermiştir. Genel olarak hücre yüzeyi hidrofobikliğin türler ve suşlar arasında farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir.

LAB Suşlarının HT-29 İnsan Epitelyum Hücrelerine Tutunumu

Bağırsaklara ulaşan probiyotik mikroorganizmaların bağırsak epiteline yapışması kolonizasyon için ön koşul olarak görülmektedir. Mikroorganizmaların peristaltik hareketlerle kolondan çıkmaması için mukozaya yapışması gerekmektedir (Nueno-Palop, & Narbad, 2011). Dolayısıyla probiyotik mikroorganizma seçiminde epitel yüzeylere güçlü tutunma gösteren suşların olmasına özen gösterilmesi gerekmektedir. Tez kapsamında incelenen 9 LAB suşları, HT-29 bağırsak epitel hücrelerine yapışabilmeleri açısından araştırılmıştır. Ayrıca referans suş olarak ta *Lb. rhamnosus* GG suşu kullanılmıştır. Tablo 17’de gösterildiği gibi *Lb. paracasei* C-7B suşu %9.54 ile HT-29 hücrelerine karşı en yüksek tutunma özelliği göstermiştir. Bu bakteriyi *Lc. garvieae* WPS-3 (%7.44), *Lb. rhamnosus* C-9A (%3.18), *Lb. paracasei* WPS-11 (%2.90) ve *Lb. plantarum* C-6A (%2.80) suşları takip etmektedir. Test edilen suşlarda en düşük tutunmayı ise, *Lb. fermentum* C-9C (%0.29) suşu göstermektedir. Şekil 27’de görüldüğü üzere tez çerçevesinde kullanılan suşların yüzde tutunum oranları değerlendirildiğinde en yüksek tutunmayı *Lb. paracasei* C-7B suşunun gösterdiği tespit edilmiştir.

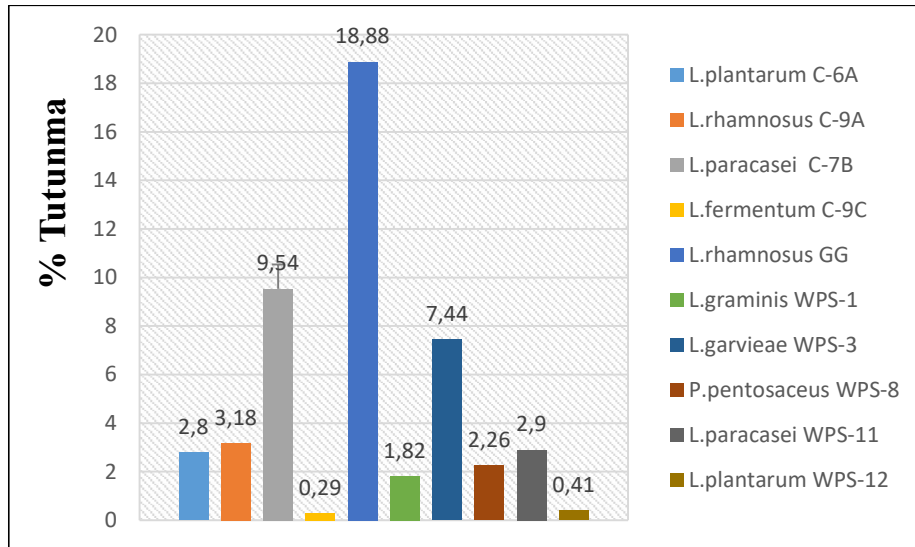
Tablo 17 . LAB Suşlarının İnsan Bağırsak Epitel HT- 29 Hücrelerine Tutunma Yeteneği

Suş	% Tutunma
C-6A	2.80 ± 0.041
C-9A	3.18 ± 0.59
C-7B	9.54 ± 1.70
C-9C	0.29 ± 0.04
LGG ^a	18.88 ± 0.44
WPS-1	1.82 ± 0.16
WPS-3	7.44 ± 0.27
WPS-8	2.26 ± 0.01
WPS-11	2.90 ± 0.04
WPS-12	0.41 ± 0.04

*ortalama ± standart sapma (n=2) , a; referans suş (*Lb. rhamnosus* GG)

Yapılan çalışmalar sonucunda *Lactobacillus* cinslerinin mukus salgılayan hücre hatlarına protein aracılığıyla bağlandığı bildirilmiştir (Coconnier, Klaenhammer, Kerneis, Bernet, & Servin, 1992). Bu bağlamda yapılan bir çalışmada Vızoso Pinto vd. (2007), bebek feçeslerinden *Lb. plantarum* BFE 1685, BFE 1685 ve *Lb. johnsonii* BFE 6128, BFE 6154 suşlarını izole etmişlerdir. İdentifiye ettiği bu suşları, probiyotik olarak bilinen *Lb. rhamnosus* GG suşu ile HT-29 insan epitel hücrelerine tutunmasını incelemişlerdir. Çalışma sonunda HT-29 hücrelerine, *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. plantarum* BFE 1684, BFE 1685 suşları sırasıyla %33.85, %45.9 ve %69.1 oranında tutunma göstermiştir ve *Lb. plantarum* suşlarının kontrol suşa göre daha yüksek tutunma gösterdiği tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında ise, referans suş olan *Lb. rhamnosus* GG ve dışkı kaynaklı *Lb. plantarum* C-6A suşu HT-29 hücrelerine sırasıyla %18.88 ve %2.80'lik tutunma gösterdiği tespit edilmiştir.

Lim, & Im (2009), dongchimi, kimchi gibi geleneksel Kore'deki fermente gıdalardan izole ettiği LAB suşlarının probiyotik potansiyellerini incelemek amacıyla suşların asit ve safra direnci ile CaCo-2 ve HT-29 hücrelerine karşı tutunmalarını belirlemek için bahsi geçen analizlere tabi tutmuşlardır. Analiz sonucunda KC-21, KC-43, MJ 54 ve SP-33 suşları, HT-29 hücrelerine karşı %20-50 arasında tutunum gösterdiği tespit edilmiştir. Fenotipik özelliklere ve çeşitli şekerlerin kullanımına bağlı olarak KC-21 suşunu *Lb. plantarum* olarak tanımlamışlardır. Yapılan bu çalışmada ise, *Lb. plantarum* WPS-12 suşunun HT-29 hücrelerine %0.41 oranında tutunum gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 27. LAB suşlarının HT-29 hücre hattına tutunum sonuçları.

Çalışma kapsamında test edilen suşların tutunma kapasiteleri değerlendirildiğinde, HT-29 hücre hattına; ekşi hamur suşlarından en yüksek tutunumu %7.44 ile *Lc. garvieae* WPS-3 suşu gösterirken, en düşük tutunumu %0.41 ile *Lb. plantarum* WPS-12 suşu göstermiştir.

Yeni doğan dışkısı suşlarından ise en yüksek tutunumu %9.54 ile *Lb. paracasei* C-7B suşu, en düşük tutunumu ise %0.29 ile *Lb. fermentum* C-9C suşu göstermiştir.

İnsan dışkısı da dahil olmak üzere farklı kaynaklardan izole edilen 7 *Lactobacillus* suşlarının HT-29 hücrelerine tutunumlarının belirlenmesinin amaçlandığı çalışma Duary vd. (2011) tarafından hücre kültürü metoduyla gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonunda en yüksek tutunma gösteren *L. plantarum* Lp91 suşunun HT-29 hücre hattına %12.8'lik bir tutunma gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada ise dışkı kaynaklı *Lb. plantarum* C-6A suşu HT-29 hücre kültürüne karşı %2.80'lik canlılık sergilemiştir.

Wang vd. (2014), bebek dışkısı ve geleneksel ürünlerden toplam 138 *Lactobacillus* suşu izole ederek içlerinden seçtikleri 10 suşun anti-proliferatif uyguladığını tespit etmişlerdir. Seçtikleri suşların HT-29 hücrelerine karşı tutunma kapasitelerini incelemişlerdir. Çalışma sonunda test ettikleri suşların %28-94 oranında tutunum gerçekleştirdiklerini belirlemişlerdir. Yapılan bu çalışma da ise, ekşi hamur ve bebek dışkısı kaynaklı *Lactobacillus* türlerinin, %0.29-9.54 tutunum göstermeleri ile yapılan çalışmaya kıyasla düşük bulunduğu belirlenmiştir.

Schillinger vd. (2005) yapmış oldukları *in vitro* çalışmada, 18 LAB suşun mukus salgılayan bağırsak epitel hücrelerine (HT-29 MTX) tutunumlarını değerlendirmişlerdir. Bu sebeple kullanılan HT-29 MTX hücre hattına karşı, referans suş *Lb. rhamnosus* GG de dahil olmak üzere *Lb. paracasei* türlerinin %20-40 arasında bir tutunma gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmada ise, *Lb. paracasei* türlerinden elde edilen bulgular, Schillinger vd. (2005) tarafından yapılan çalışmadan bir hayli düşük bulunmuştur.

Mathara vd. (2008), geleneksel üründen izole edilen 23 *Lactobacillus* suşunun fonksiyonel özelliklerini incelediği çalışmada, mukus salgılayan HT-29 MTX hücre hattında *Lb. rhamnosus* BFE 5264 suşunun %62'lik bir tutunma gösterdiğini tespit ederken, *Lb. paracasei* BFE suşunun %42'lik bir tutunum gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu çalışma da ise, *Lb. rhamnosus* BFE 5264 ve *Lb. paracasei* BFE suşlarının çalışmada kullanılan *Lb. paracasei* WPS-12 ve C-7B suşlarının tutunum yüzdeleri yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Lee vd. (2011), Kimchi'den izole ettikleri *Lactobacillus* suşlarının fonksiyonel özelliklerini araştırmayı amaçlamışlardır. Bu kapsamda 11 tane *Lb. sakei* ve 1 tane *Lb. plantarum* türün tanısını yapmışlardır. İdentifiye ettiği suşların HT-29 bağırsak epitel hücrelerine karşı tutunumlarını incelemişler ve referans suş olarak da *Lb. rhamnosus* GG kullanmışlardır. Çalışma sonunda *Lb. plantarum* NR74 suşunun HT-29 kolon hücrelerine %6.9 oranında tutunduğunu rapor etmişlerdir. Yapılan tez çalışmasında ise, *Lb. plantarum* C-6A ve

WPS-12 suşları HT-29 hücrelerine sırasıyla %2.80 ve %0.29 oranında tutunum gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Lee vd. (2011)'in yaptığı çalışmaya kıyasla düşük bulunmuştur.

Tuomola, & Salminen (1998) *in vitro* modelleme ile 12 farklı *Lactobacillus* suşunun Caco-2 hücre hattına tutunmaları incelemiştir. Caco-2 hücre hattına, insan dışkısı kaynaklı *Lb. rhamnosus* türünün tutunma kapasitesinin %7.2 olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada ise, dışkı kaynaklı *Lb. rhamnosus* C-9A suşu %3.18 oranında tutunum göstermiştir.

Yapılan bir çalışmada Wang vd. (2008), farklı kültür koleksiyonlarından izolat elde ederek çalışmalarını yürütmüşlerdir. Bu kapsamda temin ettikleri *Lb. reuteri*, *Lb. johnsonii*, *Lb. gasseri*, *Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. bulgaricus* ve *Lb. plantarum* türlerini ilgili besiyerinde (MRS Broth) geliştirerek bu türlerin HT-29 hücrelerine tutunumlarını değerlendirmişlerdir. Çalışma sonunda *Lactobacillus* türlerinin HT-29 hücre kültürüne ne kadar tutunduğunu yüzde cinsinden ifade etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada en yüksek tutunmayı %21.30 ile *Lb. reuteri* JCM 1081 suşu gösterirken en düşük tutunmayı ise %3.30 ile *Lb. acidophilus* 1.1878 suşunun gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca *Lb. rhamnosus* 1.120 suşunun %13.78 oranında tutunduğunu, *Lb. plantarum* 6003 suşunun ise, %6.14 oranında tutunduğunu saptamışlardır. Yapılan bu tez çalışmasında ise, *Lb. rhamnosus* C-9A suşu %3.18, *Lb. plantarum* WPS-12 ve C-6A suşları sırasıyla %0.41 ve %2.80 oranında tutunduğu tespit edilmiştir.

Düşük pH ve Safra Tuzu Toleransının Belirlenmesi

Potansiyel probiyotik suşların değerlendirilmesinde bir diğer önemli kriterde suşun düşük pH ve safra tuzuna karşı toleranslı olmasıdır. Test edilen suşlar ve kontrol probiyotik referans suş olan *L. rhamnosus* GG, %1 olacak şekilde MRS broth besiyerinde inoküle edilerek 0.4.8. ve 24. saatlik maruziyetin ardından hayatta kalma oranlarının tespiti için spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır. Sürenin artmasına bağlı olarak optikal yoğunlukta ve canlılıkta ciddi düşüşler görülmektedir. 24 saatlik inkübasyonun sonunda, pH 4'de %1.5, %0.3 safra tuzunda ise, %35.1'e kadar canlılıkta azalma görülmüştür. pH 4'de en düşük hücre canlılığı %1.5 ile *P. pentosaceus* WPS-8 suşunda, en yüksek canlı bakteri sayısı %85.7 ile *Lb. fermentum* C-9C suşunda tespit edilmiştir. N-hexadecane çözücüne karşı yüksek tutunma gösteren *P. pentosaceus* WPS-8 suşunun pH 4 değerinde zayıf direnç, düşük hidrofobisite özellik gösteren *Lb. fermentum* C-9C suşunun ise, düşük pH'ya karşı yüksek canlılık gösterdiği gözlenmiştir. %0.3'lük safra tuzuna karşı, en düşük dirençlilik %35.11 ile *Lb. rhamnosus* C-9A, en yüksek dirençliliği ise, %91.49 ile *Lb. fermentum* C-9C suşu göstermiştir. Bu bakteriyi *Lb. plantarum* WPS-12 (%84.10), *Lb. planatrum* C-6A (%82.16), *Lb. paracasei* WPS-11 (%80.06) suşları takip etmektedir. Bu sonuç, %0.3 safra tuzunun bu suşların canlılığını

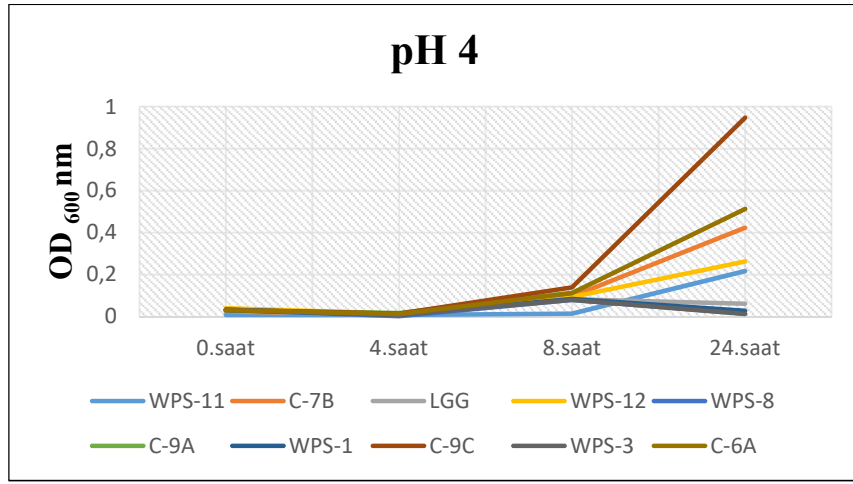
etkilemediğini göstermektedir. Düşük pH ve safra tuzuna karşı direnç spektrofotometrik metotla belirlenmiş olup Tablo 18’de OD₆₀₀ nm dalga boyunda okunan değerler verilmektedir. Şekil 28 ve 30’da ise test edilen suşların sırasıyla pH 4 ve %0.3 safra tuzu konsatrasyonunda 24 saatlik inkübasyon periyodunda büyüme eğrileri gösterilmektedir. Referans olarak kullanılan *L. rhamnosus* GG’nin pH 4’de 24 saatlik inkübasyon sonunda %5.16 canlılık gösterirken, % 0.3 safra tuzunda %55.49 canlılık gösterdiği tespit edilmiştir.

Tablo 18. *LAB Suşlarının pH 4 ve %0.3 Safra Tuzundaki Tolerans Sonuçları*

	0. saat			4. saat		
	Kontrol	Safra	pH	Kontrol	Safra	pH
WPS-11	0	0.008±0.01	0.008±0.01	0.076±0.01	0.041±0.01	0.008±0
C-7B	0	0.006±0.01	0.025±0.04	0.173±0	0.016±0	0.007±0
LGG	0	0.009±0.01	0.027±0.04	0.155±0	0.012±0	0.005±0
WPS-12	0	0.002 ±0	0.040±0.05	0.170±0.01	0.029±0	0.014±0.01
WPS-8	0	0.001 ±0	0.032±0.04	0.123±0.01	0.008±0	0.002±0
C-9A	0	0.002 ±0	0.030±0.04	0.199±0.01	0.030±0	0.016±0
WPS-1	0	0.005 ±0	0.030±0.04	0.162±0.01	0.014±0	0.007±0
C-9C	0	0.002 ±0	0.032±0.04	0.270±0.01	0.053±0.01	0.014±0
WPS-3	0	0.008 ±0	0.034±0.04	0.386±0.01	0.019±0.01	0.007±0
C-6A	0	0.001±0	0.031±0.04	0.224±0.01	0.064±0	0.012±0
	8. saat			24. saat		
	Kontrol	Safra	pH	Kontrol	Safra	pH
WPS-11	0.798±0.03	0.420±0.04	0.013 ±0	1.219 ±0.03	0.976 ±0.11	0.216±0.01
C-7B	0.403±0.01	0.100±0.01	0.094 ±0	1.057 ±0.34	0.622 ±0.15	0.423±0.00
LGG	0.340±0.01	0.06 ±0.01	0.083 ±0	1.182 ±0.15	0.656 ±0.11	0.061±0
WPS-12	0.682±0.02	0.327±0.02	0.093 ±0	1.120 ±0.04	0.941 ±0.02	0.263±0.04
WPS-8	0.058±0.01	0.042±0.01	0.079 ±0	0.866 ±0.03	0.416 ±0.03	0.013±0
C-9A	0.637±0.03	0.123±0.01	0.113 ±0	1.105 ±0.19	0.388 ±0.06	0.512±0.15
WPS-1	0.525±0.02	0.094±0.01	0.084 ±0	0.925 ±0.02	0.357 ±0.01	0.028±0.01
C-9C	0.849±0.08	0.442±0.01	0.139 ±0	1.105 ±0.05	1.011 ±0.08	0.947±0.06
WPS-3	0.526±0.004	0.261±0.01	0.079 ±0	0.573 ±0.02	0.428 ±0.07	0.012±0
C-6A	0.883±0.014	0.625±0	0.112 ±0	1.290 ±0.05	1.069 ±0.06	0.513±0.02

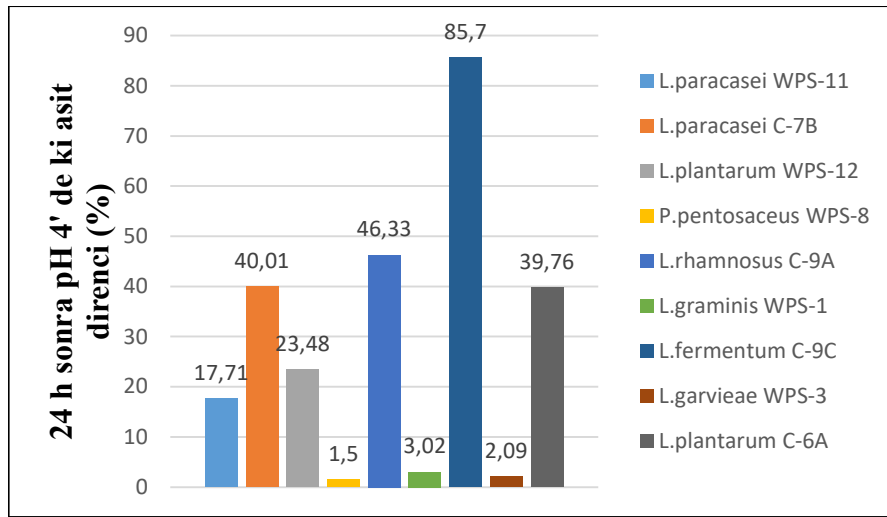
* Kontrol,(MRS Broth); Safra, (MRS Broth+%0.3 safra tuzu), pH, (pH 4’e ayarlanmış MRS Broth)ortamlarında geliştirilen kültürlerin spektrofotometrede OD₆₀₀ nm dalga boyunda 0.4.8. ve 24. saatte okunan değerler tabloda verilmektedir. Veriler üç ölçümün ortalaması olup standart sapmalar değerlerin yanında verilmektedir (n=3)

Tablo 18’den görüldüğü üzere test edilen LAB suşların pH 4’de 24 saatlik inkübasyon sonunda canlılıklarında önemli oranda düşüş görülmüştür. Bu çalışmaya benzer olarak Klingberg, Axelsson, Naterstad, Elsser, & Budde (2005) yapmış oldukları çalışmalarda, pH 2.5’de test edilen suşların canlılıklarını önemli ölçüde kaybettiğini bildirmiştir. Rapor edilen bu sonuç, bizim çalışmamızı desteklemektedir.



Şekil 28. pH 4’de suşların farklı sürelerde, OD_{600 nm} dalga boyunda okunan absorbans değerleri.

Şekil 28’den görüldüğü üzere *Lb. paracasei* WPS-11 suşunda, ilk 8 saat boyunca anlamlı derecede gelişme görülmezken, diğer izolatlarda ise ilk 4 saat boyunca gelişme gözlemlenmemiştir. 8. saat sonunda suşların geneli büyüme eğrisinde artış gösterirken *Lc. garvieae* WPS-3 ve LGG suşunda düşüş tespit edilmiştir. Analiz sonucunda pH 4’de 24 saatlik inkübasyon sonunca en yüksek artışı *Lb. fermentum* C-9C suşu gösterirken, *Lc. garvieae* WPS-3 suşu en az artış gösteren suş olduğu tespit edilmiştir. Genel itibariyle sonuçlar değerlendirildiğinde pH 4’de 24 saatlik inkübasyon periyodu sonunda ekşi hamur izolatlarının bebek dışkısı kaynaklı izolatlardan daha hassas olduğu saptanmıştır. Asidik ortamda bakteri hücrelerinin büyük çoğunluğunun hasar gördüğü ve inkübasyon süresinin artmasıyla birlikte kısmi olarak zarar gören hücrelerin canlılıklarında az da olsa artış gözlemlenmiştir. Bakterilerin pH 4’te canlılığı kontrole göre kıyaslanmış olup Şekil 29’da %canlılıkları verilmektedir.

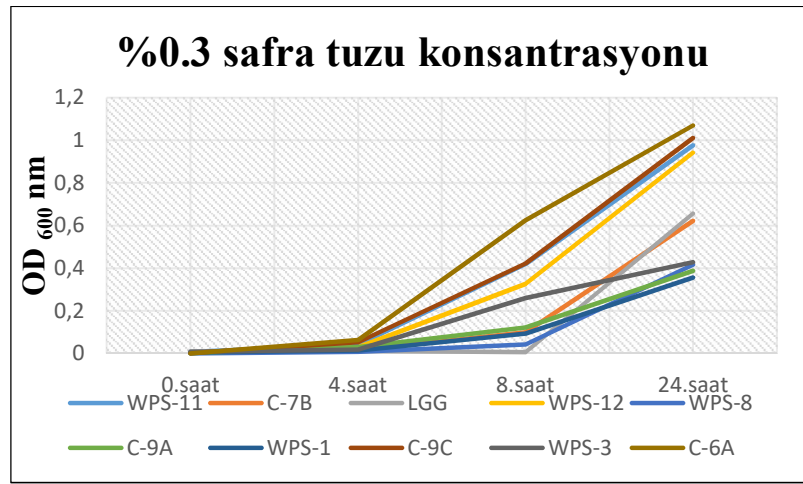


Şekil 29. LAB suşlarının pH 4'de 24 saatlik inkübasyon sonucunda elde edilen %canlılık sonuçları (%Canlılık: $OD_2 / OD_1 \times 100$, OD_1 ; 24 saat sonra okunan kontrolün OD değeri, OD_2 ; 24 saat sonra pH 4'te okunan OD değeri).

Test edilen suşlarda % canlılık en yüksek %85.7 ile *Lb. fermentum* C-9C suşunun olduğu tespit edilmiştir. Bu bakteriyi ise *Lb. rhamnosus* C-9A (%46.33) ve *Lb. paracasei* C-7B suşları (%40.01) takip etmektedir. pH 4'te yüksek dirençliliği bebek dışkısı kaynaklı suşların olması dikkat çekmektedir. Ayrıca bu durum, ilgili suşların gastrik şartlarda canlı kalabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan bir çalışmada araştırmacılar, sağlıklı insan dışkılarında yedi potansiyel LAB suşu izole edilerek bu suşların asit ve safra toleransını değerlendirmişlerdir. LAB suşları arasında bulunan *Lb. fermentum* F53 suşunda, pH 2'de 2 saatlik bir inkübasyonun sonunda %69.87'lik bir canlılık gözlemlenmiştir (Pereira, & Gibson, 2002a). Bu tez çalışmasında ise, yenidoğan dışkısı kaynaklı *Lb. fermentum* C-9C suşu pH 4'de 24 saatlik bir inkübasyon sürecinden sonra %85.70'lik bir canlılık olduğu tespit edilmiştir. Uzun bir inkübasyon periyodundan sonra yüksek canlılık gösteren bu suşun potansiyel probiyotik niteliği taşıdığı düşünülmektedir.

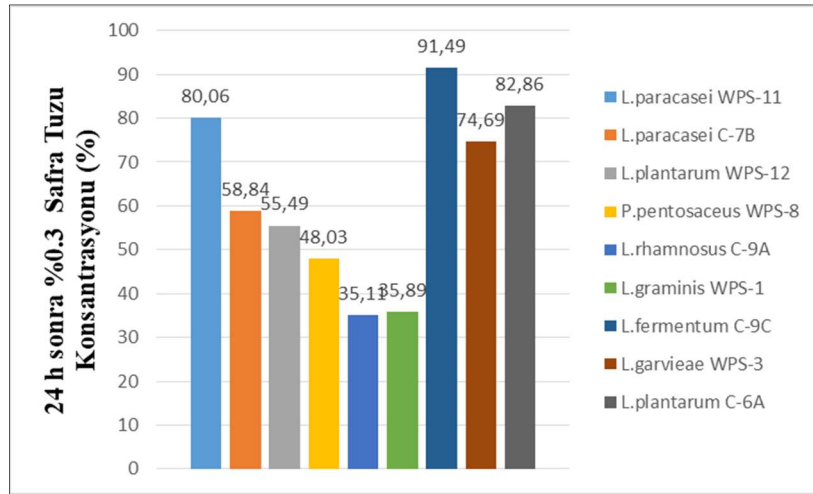
Huang vd. (2013), kefir tanelerinden izole ettikleri suşları moleküler metodlarla tanımlayarak *Lb. plantarum* Lp09 ve *Lb. plantarum* Lp45 suşlarını elde etmişler ve bu suşların probiyotik olabileceğini varsayarak karakterizasyonlarını yapmayı amaçlamışlardır. Analiz sonucunda, *Lb. plantarum* Lp09, *Lb. plantarum* Lp45 ve referans suş *Lb. plantarum* ATCC 8014 suşlarında, pH 3'te 3 saatlik inkübasyon sonunda sırasıyla %62.39, %52.40 ve %50.76 canlılık olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan bu çalışma da ise, *Lb. plantarum* WPS-12, *Lb. plantarum* C-6A suşları, pH 4'de 24 saatlik inkübasyon sonunda sırasıyla, %23.48, %39.76 olarak kaydedilmiştir.



Şekil 30. %0.3 Safra tuzu konsantrasyonunda suşların farklı sürelerde, OD₆₀₀ nm dalga boyunda okunan absorbans değerleri.

Probiyotik mikroorganizma seçiminde dikkat edilmesi gereken hususlardan birisi de, safra tuzu konsantrasyonunda bakteri hücrelerinin zarar görmeyerek canlı kalabilmesidir. Dolayısıyla probiyotik olabileceği öngörülen suşların belirli saat aralığında %0.3 safra konsantrasyonundaki canlılığı incelenmiş ve en çok artışı *Lb. plantarum* C-6A suşunun gösterdiği tespit edilmiştir. *Lb. plantarum* suşunu, *Lb. fermentum* C-9C ve *Lb. paracasei* WPS-11 suşları takip etmiştir. Genel olarak safra konsantrasyonunda, test edilen suşların yüksek oranda canlı kalabildiği ve 24 saatlik inkübasyonda üreme gösterdiği saptanmıştır. Bu durumdan yola çıkarak test edilen suşların intestinal sıvıda canlı kalabilme potansiyelinin yüksek olabileceği düşünülmektedir. Tez kapsamında incelenen suşların %0.3 safra tuzu konsantrasyonundaki canlı kalabilme yüzdeleri kontrole göre kıyaslanmış olup elde edilen veriler Şekil 31’de gösterilmektedir.

Yapılan bir çalışmada, *Lb. plantarum* P251b1 suşu, %0.3 safra konsantrasyonundaki direnci test edilmiştir. Çalışmada sonucunda P251b1 izolatı başlangıçta 8 logkob/mL iken, 4 saatlik inkübasyondan sonra 7.78 logkob/mL’ye düşerek %97 canlılık göstermiştir (Seddik vd., 2017). Yapılan bu çalışmada ise *Lb. plantarum* suşlarında ilk 4 saatte OD değerinde bir yükseliş meydana gelmemiştir. 24 saatlik inkübasyonun sonunda incelenen *Lb. plantarum* suşlarında %55 ile %82’lik bir canlılık gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 31. LAB suşlarının %0.3 safra tuzu konsantrasyonunda 24 saatlik inkübasyon sonucunda elde edilen %canlılık sonuçları (%Canlılık: $OD_2 / OD_1 \times 100$, OD_1 ; 24 saat sonra okunan kontrolün OD değeri, OD_2 ; 24 saat sonra %0.3 safra tuzunda okunan OD değeri).

Bu çalışma kapsamında incelenen suşların genel olarak safra toleransının yüksek olduğu belirlenmiştir. Şekil 31’den görüldüğü üzere, test edilen suşlarda safra toleransı $> \%35$ oranında tespit edilmiştir. Analiz sonucunda en yüksek canlılığı $\%91.49$ ile *Lb. fermentum* C-9C suşu gösterirken, en düşük canlılığı $\%35.11$ ile *Lb. rhamnosus* suşunun gösterdiği tespit edilmiştir.

Ding, & Shah (2007) yaptıkları çalışmada, probiyotik suşların aljinat ile mikroenkapsülasyonlanmasının probiyotik suşların düşük pH ve safra tuzunda hayatta kalmayı nasıl etkileyeceğini incelemiştir. Kontrol amaçlı hiçbir işlem görmemiş probiyotik LAB suşlarını kullanmıştır. Çalışma sonunda, *Lb. rhamnosus* suşunun inkübasyon başlangıcında $10.01 \log_{\text{kob}}/\text{mL}$ iken, 2 saatlik inkübasyon sonunda $3.41 \log_{\text{kob}}/\text{mL}$ ‘ye kadar düşmüş olup, $\%34.06$ ’lık bir canlılık görülmüştür. *Lb. plantarum* ve *Lb. paracasei* suşları inkübasyon başlangıcında sırasıyla $10.59 \log_{\text{kob}}/\text{mL}$ ve $10.69 \log_{\text{kob}}/\text{mL}$ iken 2 saatlik inkübasyon sonunda $3.98 \log_{\text{kob}}/\text{mL}$ ($\% 37.59$) ve $3.78 \log_{\text{kob}}/\text{mL}$ ($\%35.36$)’lık bir canlılık tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışma da ise, potansiyel probiyotik olarak görülen *Lb. rhamnosus* C-9A, *Lb. plantarum* WPS-12, *Lb. plantarum* C-6A, *Lb. paracasei* WPS-11 ve *Lb. paracasei* C-7B suşlarında sırasıyla $\%46.33$, $\%23.48$, $\%39.76$, $\%17.71$ ve $\%40.01$ ’lık bir canlılık tespit edilmiştir.

Wang, Zhang, Chen, Chen, & Bao (2012) yaptıkları çalışmada, Çin’de geleneksel ev yapımı kıymız ürünlerinden 68 *Lactobacillus* suşu izole etmişlerdir. Bu suşlardan 3 tanesi seçilerek, safra tuzu direnci ve asit toleransı araştırılmıştır. Araştırmanın sonunda, pH 3’deki canlılık *Lb. plantarum* LIP-1 suşunda $\%31.81$ olarak görülürken, *Lb. fermentum* E7301 suşunda $\%29.28$ tespit edilmiştir. $\%0.3$ safra tuzu konsantrasyonunda *Lb. plantarum* LIP-1 suşunda canlılık $\%91.13$ olarak görülürken, *Lb. fermentum* E7301 suşundaki canlılık $\%90.11$ olarak

gözlenmiştir. Yapılan tez çalışmasında ise, elde edilen bulgular bu çalışma ile yüksek oranda benzerlik göstermektedir. Dikkat çeken durum ise Wang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *Lb. fermentum* E7301 suşu için, pH 3'te %29.28 oranında canlılık elde ederken, bu tez çalışmasında ise pH 4'te *L.fermentum* C-9C suşu için %85.70 oranında yüksek bir canlılık elde edilmesidir.

Tulumoglu vd. (2013), çocukların feçeslerinden izole ettikleri 20 laktobasil suşlarının probiyotik potansiyellerini ve bu suşların pH 2 2.5 ve 3'de hayatta kalma yetenekleri araştırmışlardır. Çalışma sonunda, asitliğin düşmesine bağlı olarak canlılıkta da yükseliş meydana geldiğine dikkat çekerek, pH 3'de *L.paracasei* (T4,T5) suşlarının canlılıklarının %88, *Lb. plantarum* (T14,T15,T21) suşlarının %64-99, *Lb. fermentum* (T16,T18,T20) suşlarının canlılıklarının ise %67-72 arasında değişkenlik gösterdiği tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise, pH 4'de *Lb. paracasei* (WPS-11, C-7B) suşlarında %17.71-40.01, *Lb. plantarum* (WPS-12, C-6A) suşlarında %28.48-39.76, *Lb. fermentum* C-9C suşunda ise %85.70 gibi bir canlılık gözlemlenmiştir.

Benzer başka bir çalışmada ise, dışkı kaynaklı pH 3'de 3 saatlik bir inkübasyonun sonunda, *Lb. fermentum* 650, 511 ve MCC 2759 suşları %95.16, %52.15 ve %93.21, %0.3 safra tuzu inkübasyonun sonra sırasıyla %98.72, %89.24 ve %93.20'lik canlılık gözlemlendiğini rapor etmişlerdir (Archer, & Halami, 2015). Bu tez çalışmasında ise, pH 4'de *Lb. fermentum* C-9C %85.7, %0.3 safra konsantrasyonunda ise %91.49 gözlemlenmiştir.

Wang, Lin, Ng, & Shyu (2010)'da, emzirilen bebeklerin dışkısından ve fermente Tayvan turşusundan izole edilen potansiyel probiyotik *Lactobacillus* suşlarının değerlendirmesini yapmışlardır. Bu amaçla *in vitro* şartlar altında tutunma kabiliyeti, patojenik bakterilere direnç ve gastrointestinal şartlara karşı gösterdiği direnç incelenmiştir. İdentifiye edilen *Lb. paracasei* F08, *Lb. rhamnosus* F14 ve *Lb. plantarum* C06 suşlarının pH 3'de ki dirençliliği sırasıyla %97.4, %88 ve %98 olarak tespit edilmiştir. %0.3 safra tuzu konsantrasyonunda, *Lb. paracasei* F08, *Lb. rhamnosus* F14 ve *Lb. plantarum* C06 suşları sırasıyla %88.9, %88 ve %48.8 oranında tolere ettiği belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada ise, bebek dışkısından izole edilen *Lb. paracasei* C-7B, *Lb. rhamnosus* C-9A ve *Lb. plantarum* C-6A suşlarının pH 4'de ki dirençliliği sırasıyla, %40.01, %46.33 ve %39.76 olarak tespit ederken, %0.3 safra konsantrasyonundaki dirençliliği sırasıyla, %58.84, %35.11 ve %82.86 olarak belirlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada, geleneksel süt ürünlerinden izole edilen *Lb. fermentum* suşlarının düşük pH ve simüle edilmiş gastrointestinal dirençliliği test edilerek probiyotik potansiyelleri değerlendirilmiştir. Simüle edilmiş gastrik şartlarda pH 2'de sadece *Lb. fermentum* F-6 suşunun

%53.7 ile hayatta kaldığı tespit etmiştir. Ayrıca test ettiği 11 *Lactobacillus* suşundan *Lb. fermentum* F6 safra tuzuna iyi tolerans gösterirken, *Lb. fermentum* IMAU60151, IMAU60083, IMAU20080 ve IMAU60120 suşları düşük tolerans göstermiştir (Bao vd., 2010). Bu tez çalışmasında ise, test edilen suşlar arasında pH 4’de ve %0.3 safra tuzu konsantrasyonunda en yüksek canlılığı *Lb. fermentum* C-9C suşu göstermiş olup fonksiyonel gıdalarda ve sağlıklı ilişkili ürünlerde aday probiyotik niteliği taşıyacağı düşünülmektedir.

Kotsou, Mitsou, Oikonomou, & Kyriacou (2008), 4, 20 ve 90 günlük sağlık Yunan bebeklerinin feçeslerinden elde edilen *Lactobacillus* suşlarının identifiye ederek *in vitro* şartlarda probiyotik özelliklerini incelemişlerdir. İzole ettikleri türler olan *Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. paracasei*, *Lb. fermentum* *Lb. delbrueckii* ve *Lb. plantarum*’un pH 3’de dirençliliklerini araştırdıkları çalışmada, türlerin 3 saatlik inkübasyon sonunda canlılıklarını yüksek oranda koruduklarını belirlemişlerdir. Safra toleransı için yaptıkları çalışmada ise %0.3’lük safra tuzunda, 24 saatlik inkübasyon sonunda *Lb. rhamnosus* LR-A1 suşu %87.11, *Lb. paracasei* LPP-A16 ve LPP-B9 suşları sırasıyla %87 ve %68, *Lb. fermentum* LF-B14, LF-B15 ve LF-B21 suşları sırasıyla, %92, %89 ve %97, *Lb. plantarum* LP-A22 ve LP-C9 suşları sırasıyla, %86 ve %88’lik bir canlılık göstermiştir. Yapılan tez çalışmasında ise, pH 4’de 24 saatlik inkübasyon sürenin ardından elde edilen bulgular *Lb. fermentum* C-9C dışında diğer suşlar yapılan çalışmadaki elde edilen bulgulardan düşük çıkmıştır. *Lb. fermentum* C-9C bu analizde %85.70’lik bir canlılıkla yukarıda bahsedilen çalışma ile benzerlik göstermektedir. %0.3’lük safra konsantrasyonunda ise elde eden bulgular bu çalışma ile benzerlik göstermiştir. Yine *Lb. fermentum* C-9C suşu safra konsantrasyonunda %91.46 gibi dirençle yüksek canlılık gösteren suş olarak belirlenmiştir.

Kirtzalidou, Pramateftaki, Kotsou, & Kyriacou (2011), doğumdan sonra inceledikleri 63 sağlıklı bebeğin (4,40 ve 90 günlük) dışkılarından izole ettikleri türlerin, pH 3’te 0 ve 3 saatlik inkübasyonu sonrasında, *Lb. fermentum* C27 (7.48 ve 7.52)logkob/ml, *Lb. paracasei* suşlarında (7.49-7.70, 7.79-7.40, 7.92-7.88, 8.30-8.29) logkob/ml ile yüksek canlılık gözlemlenmiştir. Safra direnci analizinde ise 24 saatlik inkübasyonun ardından, *Lb. fermentum* C-27 ve C-14 suşlarında sırasıyla %97 ve %95 *Lb. paracasei* suşlarında (%81, 99, 95.71, 93.85, 89.87) gözlenirken, *Lb. rhamnosus* C58 ve C44 suşlarında %89 ve %100 oranında canlılık gözlemlenmiştir. Yapılan bu çalışmada ise, bebek dışkısı kaynaklı LAB suşlarında, 24 saatlik inkübasyon sonunda pH 4’de, *Lb. fermentum* C-9C suşunda %85.90, *Lb. paracasei* WPS-11 ve C-7B suşlarında sırasıyla %17 ile %40, *Lb. rhamnosus* C-9A suşunda ise %46.33’lük bir canlılık tespit edilirken safra direnci analizinde, bu suşlardaki canlılık sırasıyla %91.46, %80.06, %58.84 ve %35.59 olarak belirlenmiştir. Genel itibarıyla sonuçlar

değerlendirildiğinde, probiyotik potansiyelini test ettiğimiz suşlar bu çalışmaya kıyasla yüksek dirençlilik göstermiştir.

Nawaz vd. (2011), Pakistan’da emzirilen sağlıklı bebeklerin dışkılarından izole ettikleri *Lactobacillus* suşlarının düşük pH’ya direçliliğini araştırdığı çalışmasında, *Lb. rhamnosus* NWS19 suşunun %90.8 oranında canlılık gösterdiğini *Lb. fermentum* suşlarının ise, %80 – 92.5 arasında canlılıklarında değişim gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Bu çalışma da ise, *Lb. rhamnosus* C-9A suşu, %46.33 ile yapılan çalışmadan düşük olarak bulunurken, *Lb. fermentum* C-9C suşunun da (%85.70) olduğu tespit edilmiş ve Pakistan’da yapılan çalışma ile paralellik gösterdiği belirlenmiştir.

Niu vd. (2019), Kore’de biber turşusundan izole ettiği *Lb. plantarum* SK 1305 suşunun probiyotik potansiyelini araştırdığı çalışmasında, bu izolatın pH 2’de ve %0.3 lük safra tuzunda sırasıyla 2 ve 4 saatlik bir inkübasyon uygulamış ve >%80 canlılık gözlemlemiştir. Yapılan bu çalışmada elde edilen sonuçlar, *Lb. fermentum* C-9C suşu hariç, pH 2’de elde edilen sonuçlardan düşük, %0.3’lük safra konsantrasyonundan sonra elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermiştir.

Verdenelli vd. (2009), insan dışkılarından izole ettikleri 11 izolattan seçtikleri *Lb. paracasei* IMC502 ve *Lb. rhamnosus* IMC501 suşlarının probiyotik potansiyellerini araştırmışlardır. Simüle ettikleri gastrik şartlarda bu suşları pH 3’te 5 saatlik bir inkübasyona bırakmışlar ve bu türlerin asidik ortama direnç gösterdiklerini saptamışlardır.

Tez kapsamında incelenen suşların pH4’de 24 saatlik inkübasyon sonrası göstermiş oldukları dirençlerin, Pereira, & Gibson (2002a) ve Bao vd. (2010)’ın elde ettiği sonuçlardan yüksek olduğu, suşların; Klingberg vd. (2005), Ding, & Shah (2007) ve Wang vd. (2012)’in elde ettiği bulgularla benzer olduğu, Wang vd. (2010), Ying Huang vd. (2013), Kirtzalidou vd. (2011) ve Kotsou vd. (2008)’in elde ettiği sonuçlardan düşük olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca LAB suşlarının, pH 4’de 4 saatlik inkübasyonda canlılıklarını korumaları ancak gelişim göstermemeleri Jacobsen vd. (1999)’ın yapmış olduğu çalışma ile benzerlik göstermektedir. Benzer olarak %0.3 safra tuzu konsantrasyonunda elde edilen sonuçlar, Wang vd. (2012), Wang vd. (2010), Bao vd. (2010) ve Kotsou vd. (2008)’in yaptıkları çalışmalarla desteklenmiştir.

Genel itibariyle probiyotik niteliği araştırılan kültürlerin pH 4’de canlılıklarını kaybetmedikleri fakat gelişimlerinde önemli oranda azalmalar meydana geldiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte %0.3 lük safra konsantrasyonunda test edilen bakteriyel suşların gelişimlerinde çok az da olsa bir düşüş meydana geldiği belirlenmiştir. Genellikle ekşi hamur kaynaklı LAB türlerinin pH’ya karşı hassasiyet gösterdiği tespit edilmiştir. Test edilen suşlar arasında hem düşük pH’ya hem de safra tuzuna karşı direnç gösteren suşların varlığı probiyotik

niteliği taşıyan türlerin olabileceğini düşündürmektedir. Bu anlamda, *Lb. fermentum* C-9C suşunun probiyotik olabileceği düşünülmektedir.

Hemolitik Aktivite

Hemolitik aktivite, probiyotik suşların seçiminde ön güvenlik koşulu olarak kabul edilmektedir. (FAO, 2002). Hemolitik aktivitenin olmaması, bakterinin virüent etkisinin olmadığı anlamına gelmektedir (De Vuyst, Moreno, & Revets, 2003). Bu kapsamda test edilen LAB suşları, insan kanında kültürlenerek hemolitik aktivitesi araştırılmış ve bütün LAB izolatlarının hemolitik aktivite göstermediği tespit edilmiştir. Angmo vd. (2016)'nın yaptıkları çalışmada, bütün LAB izolatlarının negatif sonuç (γ –hemoliz) vermesi yapılan bu çalışmayı desteklemektedir. Benzer olarak Niu vd. (2019), Kalui, Mathara, Kutima, Kiiyukia, & Wongo (2009) ve Anas, Eddine, & Mebrouk (2008)'ın yaptığı çalışmalarda elde ettikleri bulgularda bu çalışmadaki sonuçları destekler niteliktedir.

İspirli vd. (2015), insan bağırsağından *E. faecium* suşlarını izole ederek bu suşların hemolitik reaksiyon gösterip göstermediğini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışma sonucunda enterokoklarda şimdiye kadar virülans faktörü belirleyicisi olan sitolizin aktivitesiyle ilgili genleri hiçbir suşun içermediği ve hemolitik reaksiyon göstermediği bahsi geçen araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmada ise, değerlendirmeye alınan suşlarda, yukarıda anlatılan çalışmada olduğu gibi hemolitik reaksiyon gözlemlenmemiştir.

Yapılan bir çalışmada, Omegisool adlı fermente edilmiş alkollü içecekten izole edilen LAB izolatlarının probiyotik potansiyeli araştırılmıştır. İdentifiye edilen *P. pentosaceus* SW01, *Lb. planatum* SW03, *Lb. plantarum* SW06 ve *Lb. plantarum* SW07 suşlarının da içlerinde bulunduğu 7 suşun hemolitik aktivitesinin araştırıldığı çalışmada, 6 suş γ - hemoliz gösterirken, *P. pentosaceus* SW01 suşunun α hemoliz gösterdiği tespit edilmiştir (Oh, & Jung, 2015). Bu duruma bakılarak suş bazında da farklılıklara olabileceği ve tür benzerliği ile bir genelleme yapılmasının yanıltıcı olabileceği somut bir şekilde ortaya konulmuştur. Sonuç itibarıyla test edilen suşların hemolitik aktivite açısından probiyotik olarak kullanımında sorun teşkil etmediği belirlenmiştir.

***In vitro* Şartlarda Gastrointestinal Sistemde Hayatta Kalma Testi**

Gastrointestinal sistemde hayatta kalma, bir probiyotik için gerekli temel özelliklerden bir tanesi olarak bilinmektedir. Dolayısıyla probiyotik mikroorganizma arayışında bulunduğu zaman potansiyel olarak görülen suşların simüle edilmiş gastrik şartlara (pH 3 + %5 pepsin) ve intestinal sistemdeki şartlara (pH 6 + %0.3 safra tuzu) karşı direnç testi yapılması

gerekmektedir. Böylece probiyotik özelliği araştırılan suşların bu şartlar altında canlılığını ne kadar devam ettirebileceği konusunda fikir sahibi olunabilmektedir. Bu kapsamda, tez çerçevesinde probiyotik potansiyeli taşıyan suşların *in vitro* şartlar altında simüle edilmiş gastrointestinal şartlardaki direçliliği belirlenmiştir. LAB suşlarının sindirim sistemi modellenmesi sonuçları Tablo 19’da, suşların düşük pH ve safra ortamında gelişim oranları ise Şekil 32’de verilmiştir. Sonuçlar genel itibariyle değerlendirildiğinde, simüle edilmiş sindirim sistemi şartlarında yüksek dirençlilik gösterdiğinden aday potansiyel probiyotik olabileceği kanaatine varılmıştır.

Tablo 19. LAB Suşlarının Sindirim Sistemi Modellemesi Dayanım Sonuçları

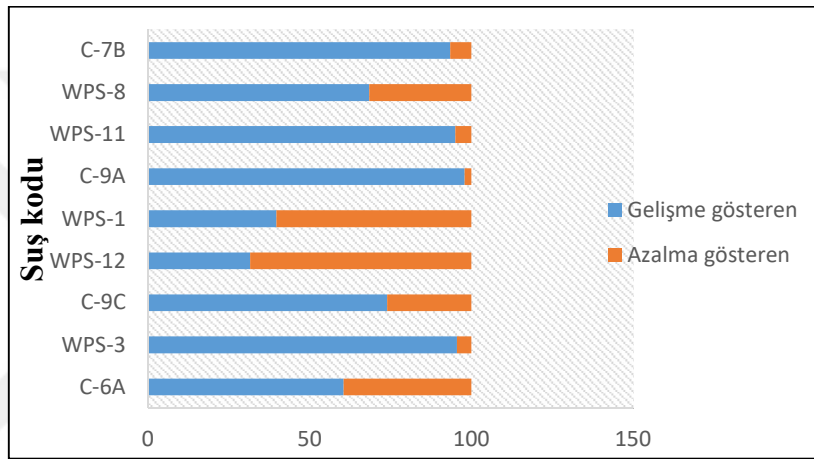
Mikroorganizma kodu	0 saat (logkob/ml)	1.5 saat (logkob/ml) pH 3 + %5 pepsin	% Canlılık (0- 1.5 saat)	2.5 saat (logkob/ml) pH 6 + %0.3 Safra tuzu	% Genel Canlılık (0-4 saat)
LGG	7.29 ± 0.04	4.76 ± 0.34	65.29	2.11 ± 0.17	28.94
C-6A	7.62 ± 0.01	5.17 ± 0.07	67.84	4.61 ± 0.55	60.49
WPS-3	7.61 ± 0.01	7.19 ± 0.02	94.48	7.27 ± 0.03	95.53
C-9C	7.72 ± 0.04	7.39 ± 0.08	95.72	5.71 ± 0.16	73.96
WPS-12	7.16 ± 0.34	4.67 ± 0.64	65.22	2.26 ± 0.13	31.56
WPS-1	6.80 ± 0.01	4.51 ± 0.16	66.32	2.70 ± 0.25	39.70
C-9A	7.21 ± 0.02	6.85 ± 0.01	95.0	7.06 ± 0.10	97.91
WPS-11	7.61 ± 0.01	6.99 ± 0.01	91.85	7.22 ± 0	94.97
WPS-8	7.35 ± 0.02	5.88 ± 0.03	80.0	5.03 ± 0.12	68.43
C-7B	7.34 ± 0.04	6.86 ± 0.02	93.46	6.86 ± 0	93.46

Maragkoudakis *vd.* (2006), süt kaynaklı 29 *Lactobacillus* suşunun probiyotik potansiyellerini *in vitro* olarak incelemişlerdir. Araştırma kapsamında test ettikleri suşların pH 1 ve pH 2’de pepsin varlığında 1 saatlik inkübasyon sonunda, canlılıklarında önemli oranda düşüş meydana geldiğini saptamışlardır. pH 2’de pepsin varlığında *Lb. paracasei* ACA-DC 130, ACA-DC 119, ACA-DC 118, ACA-DC 116 ve ACA-DC 117 suşlarında sırasıyla %84, %53, 0, %64 ve 0, *Lb. plantarum* ACA-DC 146 suşunda %66 ve *Lb. rhamnosus* ACA-DC suşunda %83 oranında canlılık gözlenmiştir. Bu çalışmada ise, *Lb. paracasei* WPS-11 ve C-7B suşları sırasıyla %91 ve %93 ile yapılan çalışmadan yüksek, *Lb. plantarum* WPS-12 ve C-6A suşları %65 ve %67 ile benzer, *Lb. rhamnosus* C-9A %95 ile yapılan çalışmadan yüksek bulunmuştur.

Argyri *vd.* (2013), yaptıkları çalışmada fermente edilmiş zeytinlerden izole LAB’ların probiyotik potansiyellerini araştırarak, fonksiyonel gıda üretimi için aday probiyotik seçmeyi amaçlamışlardır. Çalışmaları sonucu düşük pH’ya karşı *Lb. plantarum* B282, E10 ve E69 suşları sırasıyla, %87, %89 ve %98, *Lb. paracasei* E93 ve E94 suşları sırasıyla, %89 ve %82

oranında canlılık tespit edilmiştir. Bu çalışmada ise, elde edilen bulgular, yapılan çalışmadaki *Lb. paracasei* türleri ile benzerlik gösterirken, *Lb. plantarum* türlerinden düşük olduğu tespit edilmiştir.

Jung, Kim, Lee, Kim, & Noh (2008) yapmış oldukları çalışmada, ekşi hamurdan izole ettiği *Lactobacillus* türünün pH 3’de 3 saatlik inkübasyona bırakmış ve *Lactobacillus* türünün %89.64’lük bir canlılık gösterdiğini tespit etmişlerdir. Yapılan tez çalışmasında ise, ekşi hamurdan izole edilen *Lactobacillus* türlerinde 90 dk’lık inkübasyonda %66 ile %94 arasında canlılık gösterirken, %0.3’lük safra konsantrasyonunda 150 dk’dan sonra canlılıkta %34’e kadar düşüş gözlemlenmiştir. Ekşi hamur suşlarından en yüksek canlılığı, %94 ile *Lb. paracasei* WPS-11 göstermiştir.



Şekil 32. Simüle edilmiş sindirim sistemi şartlarında LAB suşlarının %gelişim ve inhibisyon oranları.

Ispirli, & Dertli (2017), geleneksel kıymız ve kuruttan *Lb. fermentum*, *Lb. helveticus* ve *E. faecalis* türlerini izole ederek karakterize etmişlerdir. Bu kapsamda *in vitro* şartlar altında inceledikleri *Lb. fermentum* AS1 ve KR10 suşlarının simüle edilmiş sindirim sisteminde sırasıyla %46.9 ve %48.8 oranında canlı kalabildiklerini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada ise, tez çerçevesinde incelenen *Lb. fermentum* C-9C suşu simüle edilmiş sindirim sisteminde %73.96 oranında canlı kalabilmiştir.

Yapılan başka bir çalışma da ise, simüle edilmiş gastrointestinal sistemde hayatta kalmak testinde pepsin varlığında, pH 2’de 1 saatlik inkübasyon sonunda, *Lb. paracasei* M5-L, *Lb. rhamnosus* J10-L ve *Lb. rhamnosus* GG suşları sırasıyla %58, %53 ve %94 canlı kalırken, %0.3 safra konsantrasyonunda 4 saatlik bir inkübasyonun ardından bu suşların canlılığı sırasıyla, %87, %90 ve %88 olarak tespit edilmiştir (Zhang vd., 2011). Bu tez çalışmasında ise, araştırılan aynı türler, pepsin varlığında pH 3 ve %0.3’lük safra konsantrasyonunda elde edilen bulgular yapılan çalışmadan yüksek olarak bulunmuştur.

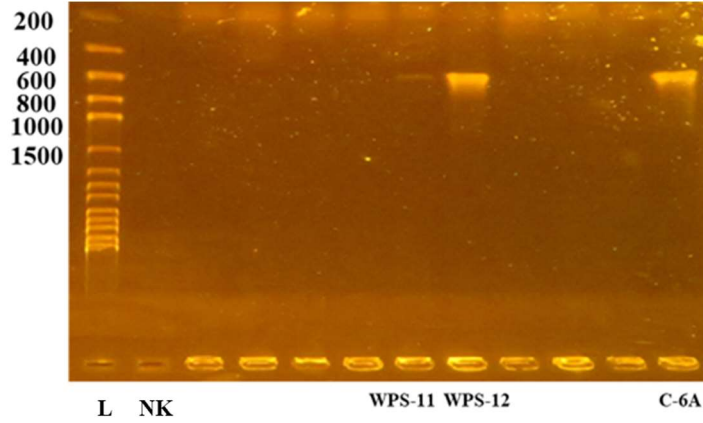
Charteris vd. (1998) yılında farklı kaynaklardan (yetişkin insan dışkısı, fermente peynir) izole ettiği *Lactobacillus* türlerini incelemişlerdir. Daha sonra bu türleri gastrointestinal şartlara benzetilen pepsin varlığında ve pH 2’de 90 dakikalık inkübasyon tabii tutmuşlardır. İnkübasyon aşamasından sonra *Lb. paracasei* F-19 suşunda (6.00-4.75)logkob/mL ile %79.16, *Lb. plantarum* KLD ve 433641 suşlarında (7.81-7.70,7.05-5.90) logkob/mL ile %98.46 ve %83.68 canlılık gözlemlenmiştir. Takiben simüle edilmiş intestinal şartta 4 saatlik inkübasyon sonunda F19, KLD ve 433641 izolatlarında sırasıyla (7.43- 5.88, 9.45-9.45, 0) logkob/mL ile %79.13, %100 canlılık tespit edilirken son izolatta ise canlılık tespit edilmemiştir. Yapılan tez çalışmasında ise, pH 3’de 90 dakikalık inkübasyon sonunda, dışkı kaynaklı *Lb. paracasei* C-7B ve *Lb. plantarum* C-6A suşlarında sırasıyla (7.34-6.86, 7.62-5.15) logkob/mL ile %93.46 ve %67.84 canlılık tespit edilmiş, safra toleransında ise, *Lb. paracasei* C-7B ve *Lb. plantarum* C-6A suşları sırasıyla (6.86-6.86) logkob/mL ile %100, (5.17-4.61) logkob/mL ile de %89.16 oranında canlılık tespit edilmiştir.

Benzer başka bir çalışmada, insan dışkısından izole edilen *Lb. fermentum* 650,511 ve MCC 2759 suşları simüle edilmiş mide sıvısında sırasıyla %76.40, %68.88 ve %94.50 oranında hayatta kalırlarken, intestinal sıvıda sırasıyla %79.64, %64.17 ve %96 oranında canlılık göstermiştir (Archer, & Halami, 2015). Yapılan bu çalışmada ise *Lb. fermentum* C-9C suşunda simüle edilmiş gastrik sıvıda %95.22 oranında canlılık gözlemlenirken, bağırsak sıvısında %77.23 oranında bir canlılık gözlenmiştir.

GAD Geni Varlığının LAB Suşlarında Taranması

Beyinde önemli bir inhibitör nörotransmitter olan biyoaktif Gamma- aminobütirik asit (GABA) insan sağlığı için önemli fizyolojik fonksiyona sahip olduğundan dolayı önemi gün geçtikçe artmaktadır (Das, & Goyal, 2015). Bu kapsamda probiyotik suş seçerken GABA sentezleyen suşların seçimi de önem arz etmektedir. GABA üretimini ardındaki biyoproses, glutamik asit dekarboksilaz (GAD) geni ile glutamatın GABA’ya dönüştürülmesidir (Capitani vd., 2003). Bu yüzden test edilen suşların GABA üretiminden sorumlu GAD geninin varlığı ekşi hamur ve yenidoğan dışkısından izole edilen suşlarının genomlarında varlığıyla ilgili primer (Tablo 7) kullanılarak PCR ile taranmıştır. Şekil 33’de ise test edilen suşlarda GAD geninin bulunup bulunmadığı gösteren agaroz jel görüntüsü verilmektedir.

Bant uzunluğu (bp)

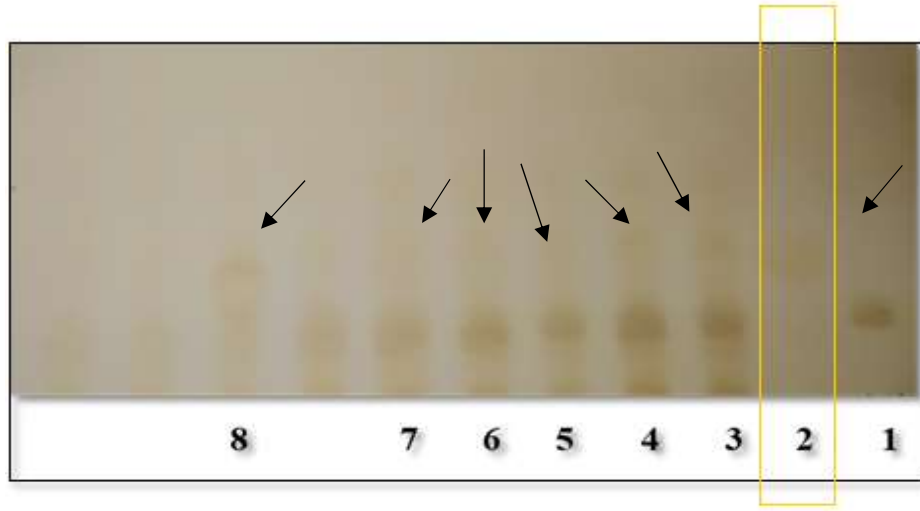


Şekil 33. Test edilen suşlarda GAD geninin taranması sonucu oluşan PCR görüntüsü (L: Ladder, NK: Negatif Kontrol, WPS-11: *Lb. paracasei*, WPS-12: *Lb. plantarum*, C-6A: *Lb. plantarum*).

Ekşi hamur kaynaklı LAB türlerinin fermantasyon sırasında GABA üretmek üzere fonksiyonellik kazandırdığı öne sürülmüştür (Villegas vd., 2016). Şekil 33’de görüldüğü üzere GAD geni ekşi hamur kaynaklı *Lb. plantarum* WPS-12, *Lb. paracasei* WPS-11 ve bebek dışkısı kaynaklı *Lb. plantarum* C-6A suşlarında pozitif çıkmıştır. Ekşi hamur kaynaklı LAB türlerinin GABA üretimi için gerekli GAD geni taşıması öne sürülen ifadeyle paralellik göstermektedir. Yapılan bir çalışmada, probiyotik olan *Lb. plantarum* DM5 suşunun GABA üretimi araştırılmış bahsi geçen suşun GABA sentezlediği tespit edilmiştir (Das, & Goyal, 2015).

GABA Üreten LAB Suşlarının Tespiti

GAD geni GABA üretiminden sorumlu olduğundan dolayı tüm suşlar GAD geni varlığı açısından PCR’da taranmıştır. PCR sonucunda 3 pozitif suş elde edilmiştir. Fakat bütün suşların GABA üretim durumları fenotipik olarak ince tabaka kromatografisinde tekrar araştırılmış ve GAD genine sahip olmayan suşlarında GABA sentezleyebildiği tespit edilmiştir.

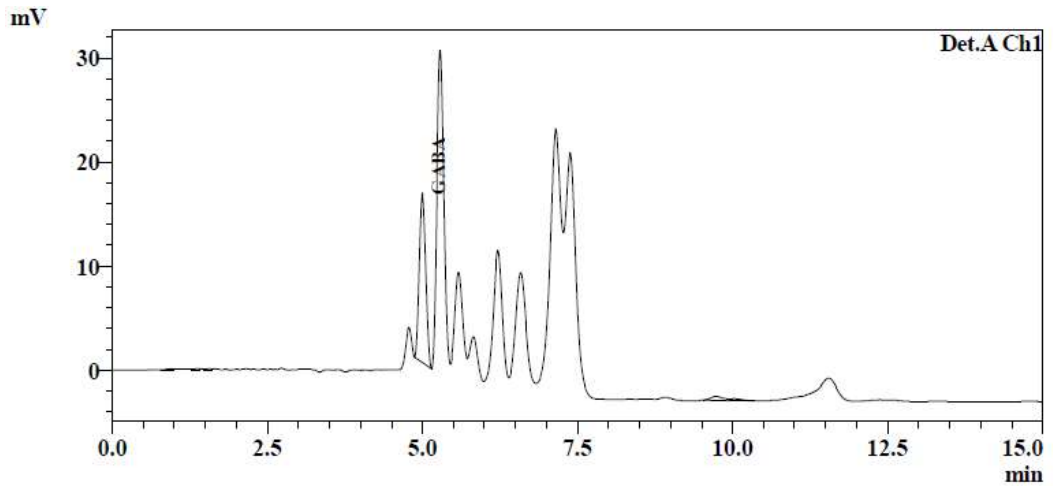


Şekil 34. GABA sentezinin ince tabaka kromatografisinde (TLC) ön değerlendirilmesi (1- MSG standardı (53 mM); 2- GABA standardı (10 mg/ml); 3- *Lb. plantarum* C-6A 'nın süpernatantı; 4- *Lb. paracasei* C-7B 'nin süpernatantı; 5- *Lc. garvieae* WPS-3'ün süpernatantı; 6- *P. pentosaceus* WPS-8 'in süpernatantı; 7- *Lb. rhamnosus* C-9A'nın süpernatantı; 8- *Lb. graminis* WPS-1'in süpernatantı. Bütün suşlar 53 mM MSG içeren MRS ortamında 30°C'de 96 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır).

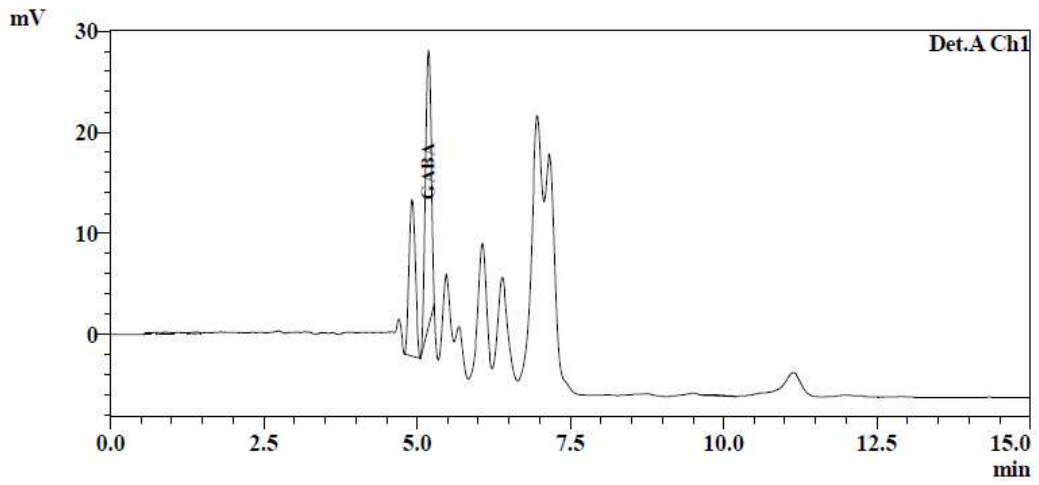
Gerekli ön işlemlerden sonra, TLC'de ön değerlendirmesi yapılan suşlar 10 mg/mL GABA standardında, kontrol olarak 53 mM MSG kullanılarak analiz yapılmıştır. Şekil 34'de görüldüğü üzere PCR'da GAD geni pozitif çıkmayan suşlarda ısıl işlem uygulandıktan sonra GABA standardının olduğu yerde renk vermiştir. PCR'da pozitif çıkmayan, *L.paracasei* C-7B, *Lc. garvieae* WPS-3, *P. pentosaceus* WPS-8, *Lb. rhamnosus* C-9A ve *Lb. graminis* WPS-1 suşları TLC'de pozitif görüntü vermiştir.

GABA Üretim Seviyelerinin Belirlenmesi

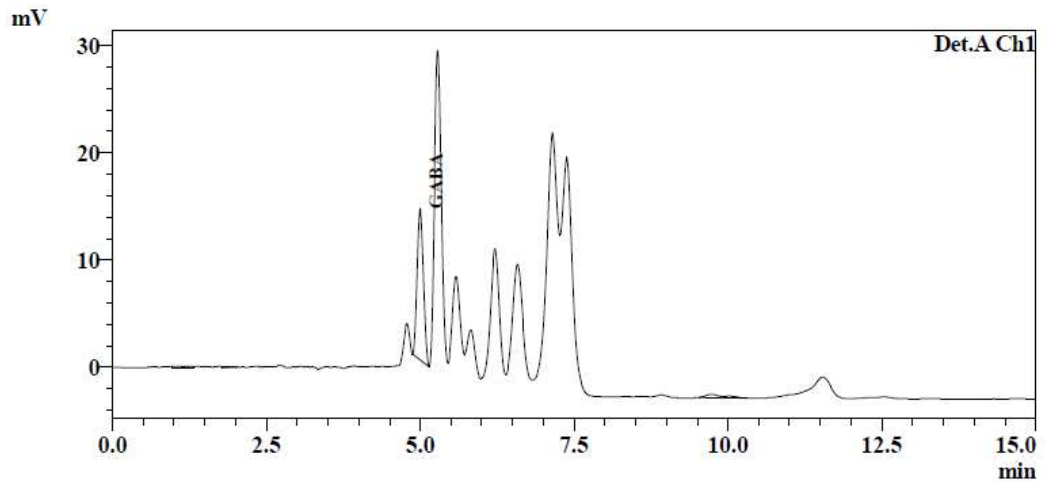
Tez kapsamında incelenen LAB suşlarının genotipik ve fenotipik taranmasını takiben bu suşların test edilen koşullar altında üretilen GABA seviyelerinin belirlenmesi için HPLC analizi yapılmış ve bütün türlerin GABA ürettiği tespit edilmiştir. HPLC analizi neticesinde GABA üretim miktarı 0.034-0.077 mg/mL arasında değiştiği tespit edilmiştir. Gamma-aminobütirik asiti en yüksek üreten suş *Lb. plantarum* WPS-12 iken, en düşük üreten suş *Lb. paracasei* C-7B suşu olmuştur. En yüksek GABA üreten *Lb. plantarum* WPS-12 suşunu, *Lb. plantarum* C-6A (0.072 mg/mL), *Lc. garvieae* WPS-3 (0.069 mg/mL) ve *Lb. paracasei* WPS-11 (0.066 mg/mL) suşu takip etmektedir. HPLC analizi sonucunda GABA'nın alıkonma süresi 4.785-4.999 dk olarak belirlenmiştir. Şekil 35-39'da LAB suşları tarafından üretilen GABA'nın HPLC kromatogramı verilmiştir.



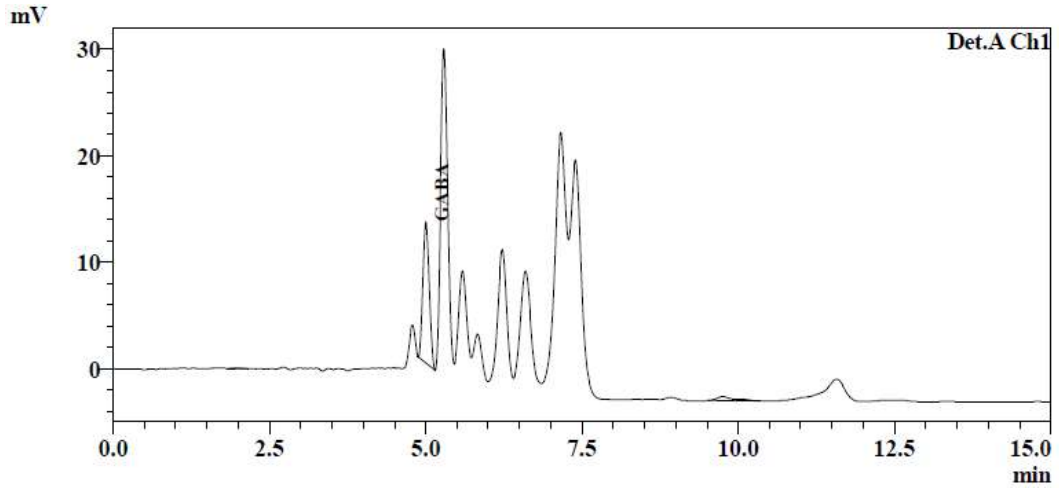
Şekil 35. *Lb. plantarum* WPS-12 tarafından üretilen GABA'nın HPLC kromatogramı.



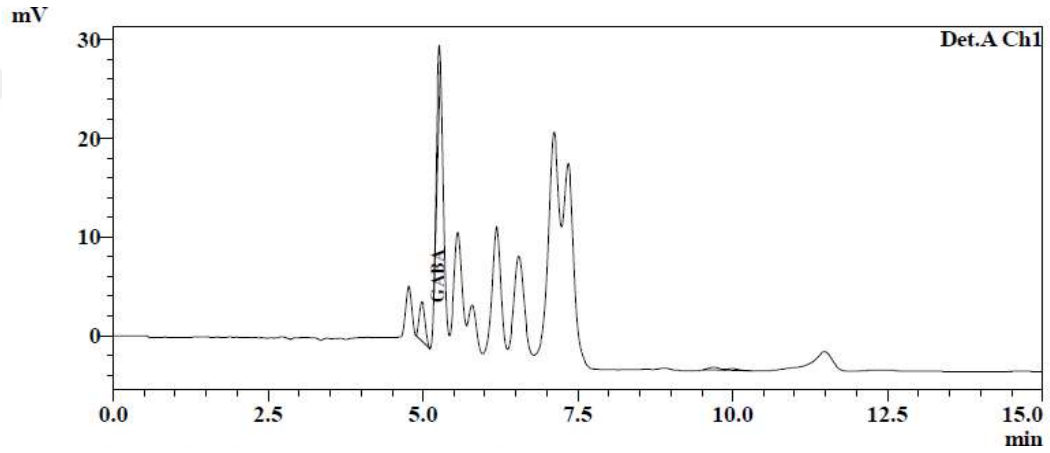
Şekil 36. *Lb. plantarum* C-6A tarafından üretilen GABA'nın HPLC kromatogramı.



Şekil 37. *Lc. garvieae* WPS-3 tarafından üretilen GABA'nın HPLC kromatogramı.



Şekil 38. *Lb. paracasei* WPS-11 tarafından üretilen GABA'nın HPLC kromatogramı.



Şekil 39. *Lb. paracasei* C-7B tarafından üretilen GABA'nın HPLC kromatogramı.

Park, Lee, & Lim (2014) yaptıkları çalışmada, kimchi'den 273 LAB izole etmiş ve %2 MSG içeren MRS ortamında 37°C'de 18 saatlik bir inkübasyon sonra her biri 50 µg/mL'den fazla GABA üreten 75 LAB suşunun olduğunu tespit etmişlerdir. Buradan seçtikleri 7 LAB suşunu %1, 2 ve 3 MSG içeren MRS ortamına inoküle ederek 37°C'de 18 saatlik inkübasyon sonrası GABA içeriklerini incelemişlerdir. Çalışma sonunda %1 MSG içeren MRS ortamında 32.84-154.86 µg/mL arasında GABA ürettiklerini tespit etmişlerdir. Test ettiği suşlar arasında olan K154 suşunun, %1 MSG içeren MRS ortamında 154.86 µg/mL olarak tespit ederken, %2 ve %3 MSG içeren MRS ortamında ise, sırasıyla 170.42 µg/mL ve 201.78 µg/mL olduğunu tespit etmişlerdir. Daha sonra K154 suşunu API metoduyla *Lb. plantarum* olarak tanımlamışlardır. Yapılan bu çalışmada ise, 53 mM MSG içeren MRS ortamında 30°C'de 96 saatlik inkübasyon sonunda test edilen LAB suşlarının 0.034-0.077 mg/mL arasında GABA ürettikleri tespit edilmiştir. Ekşi hamur kaynaklı *Lb. plantarum* WPS-12 suşu 0.077 mg/ml ile en yüksek GABA üreten suş olarak tespit edilmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada Lim, Kim, & Do (2009), fermente ürünlerde başlatıcı starter kültür elde etmek için çiğ süttten bakteri izole etmişlerdir. Araştırmacılar, %1 MSG içeren %10 yağsız süt ortamında ticari suşların 5-30 µg/ml GABA ürettiğini tespit etmiş iken, çiğ süttten izole ettiği *Lb. acidophilus* RMK 567 suşunun 711 µg/g seviyesinde GABA ürettiğini tespit etmişlerdir. Benzer başka çalışmada ise, Kore’de yapılan ev tipi turşudan *Lb. plantarum* KTU 102 suşu izole edilerek 24 saatlik fermantasyon sonunda %0.6 MSG içeren %8 yağsız süt ortamında 33 µg/ml GABA ürettiğini bildirilmiştir (Tung, Lee, Liu, & Pan, 2011). Yapılan tez çalışmasında ise, ekşi hamur kaynaklı *Lb. plantarum* WPS-12 suşunun 53 mM MSG içeren MRS ortamında 0.077 mg/mL GABA ürettiği tespit edilmiştir.

Demirbaş vd. (2017), ekşi hamurdan LAB suşları izole ederek GABA üretim miktarlarını incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmanın sonucunda *Lb. plantarum* SC-9 ve ED-1 suşlarında sırasıyla 4.92 mM ve 15.47 mM GABA ürettiğini tespit ederken, *Lb. graminis* suşunda 3.90 mM GABA ürettiklerini tespit etmişlerdir. Yapılan bu tez çalışmasında ise, ekşi hamur kaynaklı *Lb. plantarum* WPS-12 suşunun 0.072 mg/mL GABA ürettiği tespit edilirken, *Lb. graminis* WPS-1 suşunda 0.048 mg/mL GABA tespit edilmiştir

BEŞİNCİ BÖLÜM

Sonuç ve Öneriler

Fermente ürünler, yapılan birçok çalışmayla probiyotik mikroorganizma açısından zengin bir kaynak olarak görülmektedir. Doğal kaynaklardan izole edilen probiyotiklerin fonksiyonel etkilerinin tam olarak anlaşılması adına *in vitro* denemelerin yanı sıra *in vivo* denemelerin yapılması son derece önem arz etmektedir. Probiyotiklerin insan sağlığına olumlu etkilerinin anlaşılmasından itibaren günümüze kadar sağlık üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Probiyotiklerin tıp alanında ilaçlara alternatif olacağı konusunda da görüşler bildirilmiştir. Bu görüşler sayesinde dünya pazarında probiyotik tüketimi tüketiciye hızla sunulmakta ve sağlık üzerine pozitif yarar sağladığı ön plana çıkartılmaktadır.

Bunun yanı sıra, doğumdan hemen sonra yenidoğan bebekler steril olarak kabul edilmektedir. Ancak zamanla tükettiği besinler ve çevresel etmenlerden dolayı bağırsak mikrobiyotası oluşmaya başlamaktadır. Bebeklerin, immün sisteminin gelişmesi için ilk 6 ay anne sütü ile beslenmesi gerekmektedir. Anne sütü ile beslenen bebeklerin bağırsak florasında Laktobasiller ve Bifidobakteriler hakim iken, formüle edilmiş bebek mamaları tüketen bebeklerin bağırsak florasında *Bacteriodes*, *Streptococcus* cinsleri ortamı hakimiyeti altına almaktadır.

Bu çalışmada da, daha önce anne sütüyle beslenen bebeklerin dışkılarından ve ekşi hamur örneklerinden izole edilerek tanımlanmış 9 LAB suşu kullanılmıştır. Bu suşların probiyotik etkilerini belirlemek amacıyla test edilen suşların homopolimerik ve heteropolimerik *eps* genlerini açığa çıkarmak ve ürettikleri EPS'leri karakterize etmek amaçlanmıştır. Ayrıca, bazı antibiyotiklere karşı duyarlılıkları, antifungal etkileri, n-hexadecane hidrokarbonu ve insan kolon HT-29 hücre hattına tutunma yetenekleri, asit ve safra toleransları, hemolitik aktiviteleri, simüle edilmiş gastrointestinal şartlardaki dirençlilikleri ve GABA üretimleri de incelenmiştir.

Çalışmada bebek dışkısı kaynaklı *Lb. fermentum* C-9C, *Lb. plantarum* C-9A, *Lb. paracasei* C-7B ve *Lb. rhamnosus* C-9A suşları ile ekşi hamur kaynaklı, *Lb. paracasei* WPS-11, *Lb. graminis* WPS-1, *Lc. garvieae* WPS-3, *P. pentosaceus* WPS-8 ve *Lb. plantarum* WPS-12 suşları kullanılmıştır.

Araştırmada, *eps* gen bölgeleri için uygun primerler kullanılmış ve *Lb. graminis* WPS-1 suşunun homopolimerik *eps* üretiminden sorumlu *LevV* geninin pozitif olduğu tespit

edilmiştir. Diğer yandan *Lb. rhamnosus* C-9A suşunun *epsA*, *epsB* ve *p-gtf* genleri içerdiği de tespit edilmiş ve bu durum suşun heteropolimerik eps ürettiği düşüncesini ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, *Lb. graminis* WPS-1 suşu *LevV* geni taşırken *epsB* ve *p-gtf* geni taşıdığıda gözlemlenmiştir. Bu durum, *Lb. graminis* WPS-1'in hem homopolimerik hem de heteropolimerik EPS üretme potansiyeli olduğunu düşündürmektedir.

Test edilen suşlarda EPS için genotipik olarak ayırım yapıldıktan sonra EPS üretim seviyeleri incelenmiş ve $314-442 \mu\text{g}/10^7$ kob olduğu tespit edilmiştir. Takiben üretilen EPS'lerin monosakkarit kompozisyonunu belirlenmesi için HPLC analizi yapılmış ve test edilen suşların tümünün EPS üretimi gerçekleştirdiği gözlenmiştir.

Probiyotik mikroorganizmalarda antibiyotik direnç genlerini aktarımı en büyük risk faktörlerinden biri olarak görülmektedir. Bebek dışkısı ve ekşi hamur suşlarının tamamı erythromycin, penicillin, chloramphenicol, tetracycline, oxytetracycline ve ampicilline karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bütün suşlar kanamycine karşı direnç gösterirken, streptomycine karşı *Lb. rhamnosus* C-9A ve *P. pentosaceus* WPS-8 suşları dışındaki tüm suşlar direnç göstermiştir.

Araştırmada kullanılan suşlar antimikrobiyal yönünden incelendiğinde, genel olarak en fazla *E.coli*'ye karşı etkili olduğu, *S. typhimurium* üzerindeki etkinin ise diğerlerine oranla daha düşük olduğu tespit edilmiştir. İki suş (*Lb. rhamnosus* C-9A, *Lb. paracasei* WPS-11) *S. typhimurium*'a karşı etki göstermezken, diğer tüm suşlar araştırma kapsamında kullanılan indikatör mikroorganizmalara (*E. coli* BC 1402, *B. cereus* BC6830, *S. typhimurium* RSSK 95091, *Y. enterocolitica* ATCC 27729, *S. aureus* ATCC 25923) karşı inhibe edici etkide bulunduğu saptanmıştır. Test edilen suşların patojen mikroorganizmalara karşı inhibistion etkisinin bulunması izole edilen LAB'ların bakteriyosin üreticisi türler olduğunu düşündürmekte ve ilerleyen çalışmalarda bakteriyosin genlerinin olup olmadığı araştırılacaktır.

Bu çalışmada, LAB türlerinin antifungal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla 6 farklı küf kullanılmış ve *Lb. fermentum* C-9C suşunun *P. chrysogenum*'a, *Lb. graminis* WPS-1 suşunun ise *A. niger* ve *P. chrysogenum*'a karşı antifungal etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca, diğer tüm suşların *F. oxysporum*, *A. niger*, *P. chrysogenum*, *B. cinerea*, *A. parasiticus* ve *A. alternata* küflerine karşı antifungal etkide bulunduğu tespit edilmiştir. Test edilen suşların genellikle *F.oxysporum*, *B. cinerea*, *A. paraciticus* ve *A. alternata* küflerine karşı yüksek inhibisyon sağladığı gözlemlenmiştir.

LAB türlerinin hidrofobisitesi değerlendirildiğinde, n-hexadecane karşı türler arasında belirgin farklılıklar gözlemlenmiştir. *Lb. fermentum* C-9C dışında diğer tüm suşlar $>25\%$ 'den fazla hidrofobisite göstermesi hücre yüzeylerinin kompleks olduğunu göstermektedir. En

yüksek hidrofobisiteyi %82.2 ile *P. pentosaceus* WPS-8 suşunun gösterdiği tespit edilmiştir. Bu bakteriyi *Lb. graminis* WPS-1 (%80.1), *Lb. plantarum* C-6A (%54.1), *Lb. paracasei* C-7B (%45.1) ve *Lc. garvieae* WPS-3 (%43.7) suşları takip etmektedir. Bu işlemin ardından test edilen tüm suşlar *in vitro* koşullar altında HT-29 insan hücrelerine tutunumları açısından incelenmiştir. Hidrofobisite testinde olduğu gibi *Lb. fermentum* C-9C suşunun, HT-29 insan kolon hücrelerine %0.29 gibi çok düşük oranda tutunum gösterdiği tespit edilmiştir. Genel olarak HT-29 hücre hattına tutunum oranları %0.29-9.54 arasında değiştiği ve en yüksek tutunumu *Lb. paracasei* C-7B suşunun gösterdiği tespit edilmişken, *Lc. garvieae* WPS-3 suşunun %7.44, *Lb. rhamnosus* C-9A suşunun %2.80, *Lb. plantarum* C-6A suşunun ise %2.80 oranında tutunma gösterdiği gözlemlenmiştir. Dolayısıyla n-hexadecane karşı yüksek tutunum gösteren bir bakterinin HT-29 hücrelerine düşük oranda tutunma gösterdiği yapılan çalışmada görülmektedir. Bu yüzden tutunma testi için, hidrokarbonlara tutunmanın tek başına yeterli olmadığı ve probiyotik mikroorganizma seçiminde türlerin tutunma özelliğini test ederken hem hem hidrokarbona hemde insan hücrelerine yüksek oranda tutunma gösteren suşların dikkate alınarak seçilmesi gerekmektedir.

Probiyotik mikroorganizmaların seçerken gastrik şartlardan canlı kalabilmesi önem arz etmektedir. Bu araştırmada, LAB suşlarının 0, 4, 8 ve 24 saatlerde pH 4 değerindeki yüzde canlılıkları spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. İnkübasyon periyodu boyunca ilk 4 saatte test edilen suşlarda kısmi olarak zarar görme olduğundan belirgin artış gözlemlenmemiştir. Ancak sürenin artmasıyla birlikte zarar gören mikroorganizmalar besiyerindeki bileşimlerden yararlanarak, belirgin olmamak şartıyla üreme göstermişlerdir. Bu durum karşısında yalnızca *Lb. fermentum* C-9C suşu etkilenmeyerek %85.7 oranında canlı kalabilmeyi başarmıştır. Özellikle ekşi hamur suşlarında pH 4'de 24 saatlik inkübasyon sonucunda büyük oranda canlılık kaybı gözlemlenmiştir. Test edilen tüm suşlarda %1.5 ile %85.7 arasında canlılık gözlemlendiği, en yüksek direnci %85.7 ile *Lb. fermentum* C-9C suşunun gösterdiği ve bu suşu ise %46.33 ile *Lb. rhamnosus* C-9A, %40.01 ile *Lb. paracasei* C-7B, %39.76 ile *Lb. plantarum* C-6A suşu ve %23.48 ile *Lb. plantarum* WPS-12 suşunun takip ettiği belirlenmiştir.

Safra toleransı da probiyotik mikroorganizmaların seçiminde önemli bir kriter olarak görülmektedir. Potansiyel probiyotik mikroorganizmaların intestinal sisteme ulaşabilmesi için gastrik şartlardan sonra karaciğerden salgılanan safraya karşı direnç göstermesi gerekir ki intestinal sisteme ulaşıp kolonize olabilsin. Bu yüzden potansiyel probiyotik olarak varsayılan suşların %0.3 oranında safra tuzuna karşı 24 saat boyunca farklı periyotlarla spektrofotometrik yöntemle canlılıkları tespit edilmiştir. Bu kapsamda, suşların %0.3 safra dirençlilikleri %35.11

ile %91.49 oranında değiştiği tespit edilmiştir. En yüksek dirençli suşun %91.49 ile *Lb. fermentum* C-9C olduğu tespit edilirken, bu suşu *Lb. plantarum* C-6A (%82.86), *Lb. paracasei* WPS-11 (%80.06), *Lc. garvieae* WPS-3 (%74.69) ve *Lb. paracasei* C-7B (%58.84) suşları takip etmektedir. Genel olarak test edilen tüm suşların >%35.11 'lik bir canlılık ile safrayı iyi derecede tolere edebildiği kanaatine varılmıştır. İzolatlarda genellikle yüksek safra toleransı tespit edildiğinden dolayı ilerleyen aşamalarda bu suşların safra tuzları hidrolazı analizinin yapılması hedeflenmektedir.

Konakçı için virülens faktörlerden birisi olan hemolitik aktivitede bu tez kapsamında incelenmiş ve suşlarda hemolitik reaksiyon tespit edilmemiştir. Dolayısıyla test edilen suşlarda hemolitik aktivite görülmediği için probiyotik olarak kullanımlarında sorun teşkil etmemektedir.

Gastrointestinal sistemden geçiş yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla *in vitro* şartlar altında sindirim sistemi modellemesi oluşturulmuştur. Bu kapsamda test edilen suşların gastrik (pH 3 ve %5 pepsin) ve bağırsak (pH 6 ve %0.3 safra) sıvılarına karşı dayanımları belirlenmiştir. Analiz sonucunda, suşlarda %31.56-97.91 oranında bir canlılık tespit edilmiştir. Simüle edilmiş sindirim sisteminde 0-4 saat arasındaki canlılıklar ekim yöntemi ile belirlenmiş olup 0. ve 4. saat sonrasında *Lb. rhamnosus* C-9A suşunda 7.21- 7.06_{logkob/ml} logaritmik units olarak 0.15'lik bir düşüş gözlenirken, *Lc. garvieae* WPS-3, *Lb. paracasei* WPS-11 ve *Lb. paracasei* C-7B suşlarında sırasıyla logaritmik units olarak 0.34, 0.39 ve 0.48'lik bir düşüş gözlemlenmiştir.

Merkezi sinir sisteminde önemli yere sahip olan GABA'nın test edilen suşlarda hangilerinin sentezleyip sentezleyemediğini test etmek için öncelikli olarak PCR ile genotipik bir ayırım yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda *Lb. plantarum* C-6A, *Lb. plantarum* WPS-12 ve *Lb. paracasei* WPS-11 suşlarının GABA retimi açısından pozitif olabilecekleri tespit edilmiştir. Takiben TLC ile fenotipik ayırım sağlanarak PCR'da GAD geni için pozitif çıkanların haricinde diğer suşlarında GABA reticileri olduğu gözlenmiştir. Daha sonra GABA retim miktarlarını kıyaslayabilmek için HPLC analizi yapılmış ve byn suşların 0.034-0.077 mg/mL arasında GABA sentezlediği tespit edilmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, *Lb. paracasei* C-7B suşu, test edilen bütün patojenlere karşı antimikrobiyal etki gösterdiğinden dolayı epitel yüzeyde bulunan patojenik mikroorganizmalara karşı biyolojik bir bariyer oluşturabileceği düşünülmektedir. Ayrıca rettiği EPS ile gastrointestinal sistemin zorlu koşullarına dayanıklılık gösterebileceği ve bağırsaklara kolonize olarak zararlı mikroorganizmalar üzerinde inhibasyon sağlayacağı da düşünülmektedir.

Test edilen suşlardan olan *Lb. paracasei* C-7B suşu; penicillin, chloramphenicol, etiyhtomycine, tetracycline, oxytetracycline ve ampicilline karşı duyarlı olması, $382 \mu\text{g}/10^7$ kob EPS üretmesi, test edilen bütün patojenler (*E. coli* BC1402, *B. cereus* BC6830, *S. tyhimurium* RSSK 95091, *Y. enterocolitica* ATCC 27729, *S. aureus* ATCC 25923) üzerinde inhibisyon sağlaması ve test edilen 6 küfe (*F. oxysporum*, *A. niger*, *P. chrysogenum*, *B. cinerea*, *A. parasiticus*, *A. alternata*) karşı antifungal aktivite göstermesi nedeniyle potansiyel probiyotik suş adayı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bu suşun, n-hexadecane hidrokarbonuna karşı %45.1 hidrofobik özellik ile HT-29 hücreleri karşı %9.54 oranında bir tutunum göstermesi, 24 saatlik bir inkübasyondan sonra pH 4’de %40.1, %0.3 safra konsantrasyonunda %58.84 oranında canlılık göstermesi, hemolitik aktivitesinin olmaması, sindirim sistemi modellenmesinde %93.46 oranında canlı kalabilmesi ve GABA üreticisi olması potansiyel probiyotik aday düşüncesini desteklemektedir.

Elde edilen bulgular doğrultusunda, *Lc. garvieae* WPS-3 suşunun test edilen analizlerde düşük pH dışında diğer özellikler bakımından iyi aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bahsi geçen suşun potansiyel probiyotik olabileceği düşünüldüğünden dolayı gastrik şartlarda canlı kalabilmesi gerekmektedir. Bu kapsamda ilgili suşu ilerleyen aşamalarda enkapsüle edilerek fonksiyonel gıda üretiminde kullanılabilir. Böylece *Lc. garvieae* WPS-3 suşunun mide asidinden etkilenmeden doğrudan bağırsaklara ulaşması sağlanabilir.

Potansiyel probiyotik olabileceği varsayılan *Lb. paracasei* C-7B ve *Lc. garvieae* WPS-3 suşlarının, EPS gen kümeleri, EPS üretim miktarı, antibiyotiyotik hassasiyeti, antimikrobiyal, antifungal aktivitesi, hidrofobisite niteliği, HT-29 hücre hattına tutunma yeteneği, düşük pH ve safra tuzuna karşı direnci, sindirim sistemi modellenmesindeki canlılığı, hemolitik aktivitesi, GABA üretimi incelenmiştir. Ancak ilerleyen dönemlerde bu suşun yapısal karakterizasyonunun tam olarak aydınlatılması adına NMR analizi, otoagregasyon, koagregasyon, safra tuzu hidrolazı aktivitesi, fenol dirençliliği, kolesterol asimilasyon yeteneği, bakteriyosin genlerinin varlığı, hidrojen peroksit üretme yeteneğinin tespiti ve müsin degradasyonu gibi özelliklerin tespit edilmesi gerekmektedir.

Kaynakça

- Abdelali, H., Cassand, P., Soussotte, V., Daubeze, M., Bouley, C., & Narbonne, J. F. (1995). Effect of dairy products on initiation of precursor lesions of colon cancer in rats. *Nutrition and cancer*, 24(2), 121–132. .
- Abe, Y., Umemura, S., Sugimoto, K.-i., Hirawa, N., Kato, Y., Yokoyama, N., Yokoyama, T., Iwai, J., & Ishii, M. (1995). Effect of green tea rich in γ -aminobutyric acid on blood pressure of Dahl salt-sensitive rats. *American journal of hypertension*, 8(1), 74-79.
- Adams, M., & Marteau, P. (1995). On the safety of lactic acid bacteria from food. *International Journal of Food Microbiology*, 27(2-3), 263.
- Ahrné, S., Lönnermark, E., Wold, A. E., Åberg, N., Hesselmar, B., Saalman, R., Strannegård, I.-L., Molin, G., & Adlerberth, I. (2005). Lactobacilli in the intestinal microbiota of Swedish infants. *Microbes and infection*, 7(11-12), 1256-1262.
- Akalın, S., Gönç, S., & Senderya, S. (2000). Probiyotik süt ürünleri ve prebiyotikler, 6. *Süt ve Ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı: sür mikrobiyolojisi ve katkı maddeleri, Tekirdağ*, 273-278.
- Akepaer, M. (2015). *Bazı Enterococcus ,Lactococcus vePediococcus Bakterilerinin Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması*. (Yüksek Lisans Tezi), Ankata Üniversitesi, Retrieved from acikarsiv.ankara.edu.tr
- Ammor, M. S., Flórez, A. B., & Mayo, B. (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 24(6), 559-570.
- Anas, M., Eddine, H. J., & Mebrouk, K. (2008). Antimicrobial activity of Lactobacillus species isolated from Algerian raw goat's milk against Staphylococcus aureus. *World J Dairy Food Sci*, 3(2), 39-49.
- Angmo, K., Kumari, A., & Bhalla, T. C. (2016). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 428-435.
- Anukam, K. C., & Reid, G. (2007). Probiotics: 100 years (1907–2007) after Elie Metchnikoff's observation. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*, 1, 466-474.
- Archer, A. C., & Halami, P. M. (2015). Probiotic attributes of Lactobacillus fermentum isolated from human feces and dairy products. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(19), 8113-8123.
- Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.-A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G.-J. E., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiology*, 33(2), 282-291.
- Arici, M., Bilgin, B., Sagdic, O., & Ozdemir, C. (2004). Some characteristics of Lactobacillus isolates from infant faeces. *Food Microbiology*, 21(1), 19-24.
- Ashraf, R., & Smith, S. (2016). Commercial lactic acid bacteria and probiotic strains-tolerance to bile, pepsin and antibiotics. *International Food Research Journal*, 23(2), 777.
- Badel, S., Bernardi, T., & Michaud, P. (2011). New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 29(1), 54-66.

- Bao, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, S., Dong, X., Wang, Y., & Zhang, H. (2010). Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control*, 21(5), 695-701.
- Beachey, E. H. (1981). Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *Journal of Infectious Diseases*, 143(3), 325-345.
- Begley, M., Hill, C., & Gahan, C. G. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(3), 1729-1738.
- Benno, Y., Sawada, K., & Mitsuoka, T. (1984). The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiology and immunology*, 28(9), 975-986.
- Berg, R. D. (1996). The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in microbiology*, 4(11), 430-435.
- Bezkorovainy, A. (2001). Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 399s-405s.
- Bilginer, H., & Çetin, B. (2019). Probiyotikler ve Belirlenmelerinde Kullanılan in vitro Testler. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 50(3), 312-325.
- Blandino, A., Al-Aseeri, M., Pandiella, S., Cantero, D., & Webb, C. (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*, 36(6), 527-543.
- Boels, I. C., Van Kranenburg, R., Kanning, M. W., Chong, B. F., De Vos, W. M., & Kleerebezem, M. (2003). Increased exopolysaccharide production in *Lactococcus lactis* due to increased levels of expression of the NIZO B40 eps gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(8), 5029-5031.
- Bounaix, M.-S., Gabriel, V., Morel, S., Robert, H., Rabier, P., Remaud-Simeon, M., Gabriel, B., & Fontagne-Faucher, C. (2009). Biodiversity of exopolysaccharides produced from sucrose by sourdough lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(22), 10889-10897.
- Boyle, R., & Tang, M. (2006). The role of probiotics in the management of allergic disease. *Clinical & Experimental Allergy*, 36(5), 568-576.
- Branda, S. S., Vik, Å., Friedman, L., & Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends in microbiology*, 13(1), 20-26.
- Burns, A., & Rowland, I. (2000). Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Current issues in intestinal microbiology*, 1(1), 13-24.
- Burns, A. J., & Rowland, I. R. (2004). Antigenotoxicity of probiotics and prebiotics on faecal water-induced DNA damage in human colon adenocarcinoma cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 551(1-2), 233-243.
- Busscher, H., Van de Belt-Gritter, B., & Van der Mei, H. (1995). Implications of microbial adhesion to hydrocarbons for evaluating cell surface hydrophobicity 1. Zeta potentials of hydrocarbon droplets. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 5(3-4), 111-116.
- Cabo, M., Braber, A., & Koenraad, P. (2002). Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the medium. *Journal of Food Protection*, 65(8), 1309-1316.
- Capitani, G., De Biase, D., Aurizi, C., Gut, H., Bossa, F., & Grütter, M. G. (2003). Crystal structure and functional analysis of *Escherichia coli* glutamate decarboxylase. *The EMBO journal*, 22(16), 4027-4037.

- Carey, M., & Duane, W. (1994). Enterohepatic circulation, p. 719-738. *The liver: biology and pathobiology*. Raven Press, Ltd., New York, NY.
- Cesena, C., Morelli, L., Alander, M., Siljander, T., Tuomola, E., Salminen, S., Mattila-Sandholm, T., Vilpponen-Salmela, T., & von Wright, A. (2001). Lactobacillus crispatus and its nonaggregating mutant in human colonization trials. *Journal of dairy science*, 84(5), 1001-1010.
- Charteris, W., & Kelly, P. (1993). In vitro antibiotic susceptibility of potentially probiotic lactobacilli and bifidobacteria. *Second Annual Report, EU FLAIR Project No. AGRF-CT91*, 53.
- Charteris, W., Kelly, P., Morelli, L., & Collins, J. (1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of applied microbiology*, 84(5), 759-768.
- Charteris, W., & Morelli, L. (1994). Report of the EU working group on antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic lactobacilli and bifidobacteria. *Third Annual Report, EU FLAIR Project No. AGRF-CT91*, 53.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., & Collins, J. K. (1998). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic Lactobacillus species. *Journal of Food Protection*, 61(12), 1636-1643.
- Chou, L.-S., & Weimer, B. (1999). Isolation and characterization of acid-and bile-tolerant isolates from strains of Lactobacillus acidophilus. *Journal of dairy science*, 82(1), 23-31.
- Clara, G., Suárez, A., Fernández-García, M., Margolles, A., Gueimonde, M., & Ruas-Madiedo, P. (2011). Adhesion of bile-adapted Bifidobacterium strains to the HT29-MTX cell line is modified after sequential gastrointestinal challenge simulated in vitro using human gastric and duodenal juices. *Research in Microbiology*, 162(5), 514-519.
- Clements, M., Levine, M., Black, R. E., Robins-Browne, R., Cisneros, L., Drusano, G., Lanata, C., & Saah, A. (1981). Lactobacillus prophylaxis for diarrhea due to enterotoxigenic Escherichia coli. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 20(1), 104-108.
- Clements, M., Levine, M., Ristaino, P., Daya, V., & Hughes, T. (1983). Exogenous lactobacilli fed to man-their fate and ability to prevent diarrheal disease. *Progress in food & nutrition science*, 7(3-4), 29-37.
- Cocconnier, M. H., Klaenhammer, T., Kerneis, S., Bernet, M., & Servin, A. (1992). Protein-mediated adhesion of Lactobacillus acidophilus BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(6), 2034-2039.
- Cole, C., Fuller, R., & Carter, S. (1989). Effect of probiotic supplements of lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium adolescentis 2204 on β -glucosidase and β -glucuronidase activity in the lower gut of rats associated with a human faecal flora. *Microbial ecology in Health and Disease*, 2(3), 223-225.
- Collado, M. C., Gueimonde, M., Hernandez, M., Sanz, Y., & Salminen, S. (2005). Adhesion of selected Bifidobacterium strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion. *Journal of Food Protection*, 68(12), 2672-2678.
- Commane, D., Hughes, R., Shortt, C., & Rowland, I. (2005). The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 591(1-2), 276-289.

- Conrad, R., & Vlassov, A. (2015). The human microbiota: composition, functions, and therapeutic potential. *Med Sci Rev*, 2, 92-103.
- Crociani, J., Grill, J. P., Huppert, M., & Ballongue, J. (1995). Adhesion of different bifidobacteria strains to human enterocyte-like Caco-2 cells and comparison with in vivo study. *Letters in Applied Microbiology*, 21(3), 146-148.
- Cummings, J. H. (1997). *The large intestine in nutrition and disease*: Institut Danone Brussels, Belgium.
- Czerwionka-Szaflarska, M., & Romańczuk, B. (2008). Probiotics—which, whom, when? *Przewodnik Lekarza/Guide for GPs*, 11(1), 214-221.
- Çakır, İ. (2003). *Laktobasillus ve bifidobakterlerde bazı probiyotik özelliklerin belirlenmesi*. (Doktora Tezi), Ankara Üniversitesi Ankara Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı -Ankara. (93s)
- Dambekodi, P., & Gilliland, S. (1998). Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Bifidobacterium longum*. *Journal of dairy science*, 81(7), 1818-1824.
- Das, D., & Goyal, A. (2015). Antioxidant activity and γ -aminobutyric acid (GABA) producing ability of probiotic *Lactobacillus plantarum* DM5 isolated from Marcha of Sikkim. *LWT-Food Science and Technology*, 61(1), 263-268.
- De Man, J., Rogosa, d., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of applied Bacteriology*, 23(1), 130-135.
- de Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Júnior, A. I. M., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology Advances*.
- De Vuyst, Moreno, M. F., & Revets, H. (2003). Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *International Journal of Food Microbiology*, 84(3), 299-318.
- De Vuyst, L., & Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology reviews*, 23(2), 153-177.
- De Vuyst, L., Moreno, M. F., & Revets, H. (2003). Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *International Journal of Food Microbiology*, 84(3), 299-318.
- De Vuyst, L., & Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1-3), 43-56.
- Demain, A. (1999). Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology*, 52(4), 455-463.
- Demirbaş, F., İspirli, H., Kurnaz, A. A., Yılmaz, M. T., & Dertli, E. (2017). Antimicrobial and functional properties of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs. *LWT-Food Science and Technology*, 79, 361-366.
- Demirgöl, F., & Sağdıç, O. (2018). Fermente Süt Ürünlerinin İnsan Sağlığına Etkisi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 13, 45-53.
- Dertli, E., Colquhoun, I. J., Côté, G. L., Le Gall, G., & Narbad, A. (2018). Structural analysis of the α -D-glucan produced by the sourdough isolate *Lactobacillus brevis* E25. *Food chemistry*, 242, 45-52.
- Dertli, E., Mercan, E., Arıcı, M., Yılmaz, M. T., & Sağdıç, O. (2016). Characterisation of lactic acid bacteria from Turkish sourdough and determination of their exopolysaccharide (EPS) production characteristics. *LWT-Food Science and Technology*, 71, 116-124.

- Di Cagno, R., De Angelis, M., Limitone, A., Minervini, F., Carnevali, P., Corsetti, A., Gaenzle, M., Ciati, R., & Gobbetti, M. (2006). Glucan and fructan production by sourdough *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9873-9881.
- Ding, W., & Shah, N. (2007). Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Food Science*, 72(9), M446-M450.
- Dodd, H., & Gasson, M. (1994). Bacteriocins of lactic acid bacteria. In *Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria* (pp. 211-251): Springer.
- Doğan, M. (2017). *Bazı Gıdalardan İzole Edilen Bakterilerin Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması* (Doktora Tezi.), İstanbul Aydın Üniversitesi,, Retrieved from <https://acikarsiv.aydin.edu.tr/>
- Donohue, D., Salminen, S., & Marteau, P. (1998). Safety of probiotic bacteria In: Lactic Acid Bacteria (Salminen, S. and von Wright, A., Eds.). In: Marcel Dekker Inc., New York.
- Donohue, D., & Salminen, S. (1996). Safety of probiotic bacteria. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 5, 25-28.
- Drasar, B., Shiner, M., & McLeod, G. (1969). Studies on the intestinal flora: I. The bacterial flora of the gastrointestinal tract in healthy and achlorhydric persons. *Gastroenterology*, 56(1), 71-79.
- Duary, R. K., Rajput, Y. S., Batish, V. K., & Grover, S. (2011). Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells. *The Indian journal of medical research*, 134(5), 664.
- Ducluzeau, R. (1993). *Development, equilibrium and role of microbial flora in the newborn*. Paper presented at the Annales de pediatrie.
- Dugas, B., Mercenier, A., Lenoir-Wijnkoop, I., Arnaud, C., Dugas, N., & Postaire, E. (1999). Immunity and probiotics. *Immunology today*, 20(9), 387-390.
- Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G., & Daly, C. (1999). Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. In *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications* (pp. 279-292): Springer.
- Dupont, I., Roy, D., & Lapointe, G. (2000). Comparison of exopolysaccharide production by strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* grown in chemically defined medium and milk. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24(4), 251-255.
- El-Gendy, S., & Marth, E. (1981). Growth and Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus* in the Presence of *Lactobacillus casei*. *Journal of Food Protection*, 44(3), 211-212.
- Elmer, G. W. (2001). Probiotics: "living drugs". *American Journal of health-system pharmacy*, 58(12), 1101-1109.
- Esclapez, M., Tillakaratne, N., Kaufman, D., Tobin, A., & Houser, C. (1994). Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *Journal of Neuroscience*, 14(3), 1834-1855.
- Falk, P. G., Hooper, L. V., Midtvedt, T., & Gordon, J. I. (1998). Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(4), 1157-1170.

- FAO, J. (2002). WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. *London, Ontario, Canada*, 30.
- FAO/WHO. (2001). Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report. In: FAO Rome, Italy.
- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *cell*, 61(5), 759-767.
- Fedorak, R. N., & Madsen, K. L. (2004). Probiotics and the management of inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, 10(3), 286-299.
- Feldblum, S., Erlander, M., & Tobin, A. (1993). Different distributions of GAD65 and GAD67 mRNAs suggest that the two glutamate decarboxylases play distinctive functional roles. *Journal of neuroscience research*, 34(6), 689-706.
- Feng, M., Chen, X., Li, C., Nurgul, R., & Dong, M. (2012). Isolation and identification of an exopolysaccharide-producing lactic acid bacterium strain from Chinese Paocai and biosorption of Pb (II) by its exopolysaccharide. *Journal of Food Science*, 77(6), T111-T117.
- Floch, M. H., Binder, H. J., Filburn, B., & Gershengoren, W. (1972). The effect of bile acids on intestinal microflora. *The American journal of clinical nutrition*, 25(12), 1418-1426.
- Fooks, L. J., Fuller, R., & Gibson, G. R. (1999). Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal*, 9(1), 53-61.
- Forestier, C., De Champs, C., Vatoux, C., & Joly, B. (2001). Probiotic activities of *Lactobacillus casei* rhamnosus: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Research in Microbiology*, 152(2), 167-173.
- Fukuda, K., Shi, T., Nagami, K., Leo, F., Nakamura, T., Yasuda, K., Senda, A., Motoshima, H., & Urashima, T. (2010). 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.
- Fuller, R. (1989). Probiotic in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, 66, 131-139.
- Fuller, R. (1991). Probiotics in human medicine. *Gut*, 32(4), 439.
- Fuller, R. (1992). History and development of probiotics. In *Probiotics* (pp. 1-8): Springer.
- Fuller, R., & Gibson, G. R. (1997). Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 32(sup222), 28-31.
- Gad, G. F. M., Abdel-Hamid, A. M., & Farag, Z. S. H. (2014). Antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from some pharmaceutical and dairy products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1), 25-33.
- Galle, S., & Arendt, E. K. (2014). Exopolysaccharides from sourdough lactic acid bacteria. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(7), 891-901.
- Galle, S., Schwab, C., Arendt, E. K., & Gänzle, M. G. (2011). Structural and rheological characterisation of heteropolysaccharides produced by lactic acid bacteria in wheat and sorghum sourdough. *Food Microbiology*, 28(3), 547-553.
- Gerbaldo, G. A., Barberis, C., Pascual, L., Dalcerro, A., & Barberis, L. (2012). Antifungal activity of two *Lactobacillus* strains with potential probiotic properties. *FEMS Microbiology Letters*, 332(1), 27-33.

- German, B., Schiffrin, E. J., Reniero, R., Mollet, B., Pfeifer, A., & Neeser, J.-R. (1999). The development of functional foods: lessons from the gut. *Trends in biotechnology*, 17(12), 492-499.
- Gibson, G. R., & Macfarlane, G. T. (1995). *Human colonic bacteria: role in nutrition, physiology and pathology*: CRC press.
- Gilliland, S., & Speck, M. (1977). Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures. *Journal of Food Protection*, 40(12), 820-823.
- Gilliland, S., Staley, T., & Bush, L. (1984). Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *Journal of dairy science*, 67(12), 3045-3051.
- Gilliland, S. E. (1990). Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology reviews*, 7(1-2), 175-188.
- Gogineni, V. K., Morrow, L. E., Gregory, P. J., & Malesker, M. A. (2013). Probiotics: history and evolution. *Journal of Ancient Diseases & Preventive Remedies*.
- Goldin, B. R., & Gorbach, S. L. (1992). Probiotics for humans. In *Probiotics* (pp. 355-376): Springer.
- Gordon, D., Macbae, J., & Wheeler, D. M. (1957). A *Lactobacillus* preparation for use with antibiotics. *Lancet*, 899-901.
- Gourama, H., (1997). Inhibition of Growth and Mycotoxin Production of *Penicillium* by *Lactobacillus* Species. *LWT-Food Science and Technology*, 30(3), 279-283.
- Gourama, H., & Bullerman, L. B. (1995). Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. *Journal of Food Protection*, 58(11), 1249-1256.
- Grönlund, M.-M., Lehtonen, O.-P., Eerola, E., & Kero, P. (1999). Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 28(1), 19-25.
- Guandalini, S., Pensabene, L., Zikri, M. A., Dias, J. A., Casali, L. G., Hoekstra, H., Kolacek, S., Massar, K., Micetic-Turk, D., & Papadopoulou, A. (2000). *Lactobacillus GG* administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 30(1), 54-60.
- Guarner, F., & Malagelada, J.-R. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*, 361(9356), 512-519.
- Guarner, F., Perdigon, G., Corthier, G., Salminen, S., Koletzko, B., & Morelli, L. (2005). Should yoghurt cultures be considered probiotic? *British Journal of Nutrition*, 93(6), 783-786.
- Gueimonde, M., & Salminen, S. (2006). New methods for selecting and evaluating probiotics. *Digestive and Liver Disease*, 38, S242-S247. doi:10.1016/s1590-8658(07)60003-6
- Hall, M., Cole, C., Smith, S., Fuller, R., & Rolles, C., (1990). Factors influencing the presence of faecal lactobacilli in early infancy. *Archives of Disease in Childhood*, 65(2), 185-188.
- Halpern, G., Vruwink, K., Van de Water, J. A., Keen, C. L., & Gershwin, M. E. (1991). Influence of long-term yoghurt consumption in young adults. *International Journal of Immunotherapy*, 7(4), 205-210.
- Hamilton-Miller, J., Gibson, G. R., & Bruck, W. (2003). Some insights into the derivation and early uses of the word 'probiotic'. *British Journal of Nutrition*, 90(4), 845-845.

- Harrison, V., & Peat, G. (1975). Serum cholesterol and bowel flora in the newborn. *The American journal of clinical nutrition*, 28(12), 1351-1355.
- Hassan, Y. I., & Bullerman, L. B. (2008). Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp. *tolerans* isolated from a sourdough bread culture. *International Journal of Food Microbiology*, 121(1), 112-115.
- Hentges, D. J. (2012). *Human intestinal microflora in health and disease*: Academic press.
- Hofmann, A. (1994). Bile acids, p. 677-718. *The liver: biology and pathobiology*. Raven Press, Ltd., New York, NY.
- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., & in't Veld, J. H. H. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41(2), 85-101.
- Holzapfel, W. H., & Schillinger, U. (2002). Introduction to pre-and probiotics. *Food Research International*, 35(2-3), 109-116.
- Hooper, L. V., & Gordon, J. I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, 292(5519), 1115-1118.
- Horn, N., Wegmann, U., Dertli, E., Mulholland, F., Collins, S. R., Waldron, K. W., Bongaerts, R. J., Mayer, M. J., & Narbad, A. (2013). Spontaneous mutation reveals influence of exopolysaccharide on *Lactobacillus johnsonii* surface characteristics. *PloS one*, 8(3), e59957.
- Huang, Y., & Adams, M. C. (2004). In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 91(3), 253-260.
- Huang, Y., Wang, X., Wang, J., Wu, F., Sui, Y., Yang, L., & Wang, Z. (2013). *Lactobacillus plantarum* strains as potential probiotic cultures with cholesterol-lowering activity. *Journal of dairy science*, 96(5), 2746-2753.
- Hughes, D. B., & Hoover, D. G. (1991). Bifidobacteria: their potential for use in American dairy products. *Food technology (USA)*.
- Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M., & Sansawa, H. (2003). Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *European journal of clinical nutrition*, 57(3), 490.
- Isolauri, E., Jalonen, T., Juntunen, M., Rautanen, T., & Koivula, T. (1990). A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus* GG) promotes recovery from acute diarrhoea in children. *Pediatric Research*, 27(5), 529.
- İspirli, H. (2016). *Tulum peynirinden Laktik asit bakterilerinin (LAB) izolasyonu, moleküler metotlarla tanımlanması ve ekzopolisakkarit (EPS) üretim Potansiyelinin genetik olarak belirlenmesi*. (Yüksek lisans tezi), Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. (104)
- İspirli, H., Demirbaş, F., & Dertli, E. (2015). Characterization of functional properties of *Enterococcus faecium* strains isolated from human gut. *Canadian journal of microbiology*, 61(11), 861-870.
- İspirli, H., & Dertli, E. (2017). Isolation and characterisation of lactic acid bacteria from traditional koumiss and kurut. *International journal of food properties*, 20(sup3), S2441-S2449.
- İspirli, H., & Dertli, E. (2018). Isolation and identification of exopolysaccharide producer lactic acid bacteria from Turkish yogurt. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(1), e13351.

- Jacobsen, C. N., Nielsen, V. R., Hayford, A., Møller, P. L., Michaelsen, K., Paerregaard, A., Sandström, B., Tvede, M., & Jakobsen, M. (1999). Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl. Environ. Microbiol.*, *65*(11), 4949-4956.
- Ji, K., Jang, N. Y., & Kim, Y. T. (2015). Isolation of lactic acid bacteria showing antioxidative and probiotic activities from kimchi and infant feces. *J. Microbiol. Biotechnol.*, *25*(9), 1568-1577.
- Jolly, L., & Stingle, F. (2001). Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene clusters in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, *11*(9), 733-745.
- Jonkers, D. M. (2016). Microbial perturbations and modulation in conditions associated with malnutrition and malabsorption. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, *30*(2), 161-172.
- Jung, S. W., Kim, W.-J., Lee, K.-G., Kim, C.-W., & Noh, W.-S. (2008). Fermentation characteristics of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria from sourdough and assessment of the isolates for industrial potential. *J. Microbiol. Biotechnol.*, *18*(7), 1266-1273.
- Kalui, C., Mathara, J., Kutima, P., Kiiyukia, C., & Wongo, L. (2009). Functional characteristics of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* from ikii, a Kenyan traditional fermented maize porridge. *African Journal of Biotechnology*, *8*(18).
- Karaoğlu, Ş. A., Aydın, F., Kilic, S. S., & Kilic, A. O. (2003). Antimicrobial activity and characteristics of bacteriocins produced by vaginal lactobacilli. *Turkish Journal of Medical Sciences*, *33*(1), 7-13.
- Kaushik, J. K., Kumar, A., Duary, R. K., Mohanty, A. K., Grover, S., & Batish, V. K. (2009). Functional and probiotic attributes of an indigenous isolate of *Lactobacillus plantarum*. *PloS one*, *4*(12).
- Keele, C., & Neil, E. (1965). Secretion of digestive juices. *Wright's applied physiology. Oxford University*, 353-363.
- Khalil, R., El-Halafawy, K., Mahrous, H., Kamaly, K., Frank, J., & El Soda, M. (2007). Evaluation of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from faeces of breast-fed infants in Egypt. *African Journal of Biotechnology*, *6*(7).
- Kirjavainen, P. V., Ouwehand, A. C., Isolauri, E., & Salminen, S. J. (1998). The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiology Letters*, *167*(2), 185-189.
- Kirtzalidou, E., Pramateftaki, P., Kotsou, M., & Kyriacou, A. (2011). Screening for lactobacilli with probiotic properties in the infant gut microbiota. *Anaerobe*, *17*(6), 440-443.
- Kitazawa, H., Harata, T., Uemura, J., Saito, T., Kaneko, T., & Itoh, T. (1998). Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *International Journal of Food Microbiology*, *40*(3), 169-175.
- Klaenhammer, T. R. (2000). Probiotic bacteria: today and tomorrow. *The Journal of nutrition*, *130*(2), 415S-416S.
- Klaenhammer, T. R., & Kullen, M. J. (1999). Selection and design of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, *50*(1-2), 45-57.

- Kleessen, B., Hartmann, L., & Blaut, M. (2003). Fructans in the diet cause alterations of intestinal mucosal architecture, released mucins and mucosa-associated bifidobacteria in gnotobiotic rats. *British Journal of Nutrition*, 89(5), 597-606.
- Klein, M., Duarte, S., Xiao, J., Mitra, S., Foster, T., & Koo, H. (2009). Structural and molecular basis of the role of starch and sucrose in *Streptococcus mutans* biofilm development. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(3), 837-841.
- Klingberg, T. D., Axelsson, L., Naterstad, K., Elsser, D., & Budde, B. B. (2005). Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 105(3), 419-431.
- Koç, M., Arpacı, B. B., Ak, A., Karataş, K., & Cotty, P. (2016). Kırmızıbiberde aflatoksin oluşturmeyan *Aspergillus flavus* izolatlarının belirlenmesi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 73(4), 323-332.
- Komatsuzaki, N., Shima, J., Kawamoto, S., Momose, H., & Kimura, T. (2005). Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiology*, 22(6), 497-504.
- Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., & Matošić, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of applied microbiology*, 94(6), 981-987.
- Kotsou, M. G., Mitsou, E. K., Oikonomou, I. G., & Kyriacou, A. A. (2008). In vitro assessment of probiotic properties of *Lactobacillus* strains from infant gut microflora. *Food biotechnology*, 22(1), 1-17.
- Kulkarni, N., & Reddy, B. S. (1994). Inhibitory Effect of *Bifidobacterium longum* Cultures on the Azoxymethane-Induced Aberrant Crypt Foci Formation and Fecal Bacterial β -Glucuronidase. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 207(3), 278-283.
- Kunz, C., Rodriguez-Palmero, M., Koletzko, B., & Jensen, R. (1999). Nutritional and biochemical properties of human milk, Part I: General aspects, proteins, and carbohydrates. *Clinics in perinatology*, 26(2), 307-333.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., & Gobbetti, M. (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(9), 4084-4090.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. (2008). Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 72(4), 728-764.
- Lee, H., Yoon, H., Ji, Y., Kim, H., Park, H., Lee, J., Shin, H., & Holzapfel, W. (2011). Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from kimchi. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 155-161.
- Lee, Y.-K., & Salminen, S. (1995). The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 6(7), 241-245.
- Lee, Y. K., Lim, C., Teng, W., Ouwehand, A., Tuomola, E., & Salminen, S. (2000). Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(9), 3692-3697.
- Legan, J. D. (1993). Mould spoilage of bread: the problem and some solutions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 32, 33-53.
- Lerche, M. (1962). Das Vorkommen aerob wachsender grampositiver Stabchen des Genus *Lactobacillus* beijerinck im Darminhalt erwachsener Menschen. *Zbl Bakt I Orig*, 185, 446-481.

- Lim, S.-D., Kim, K.-S., & Do, J.-R. (2009). Physiological characteristics and GABA production of *Lactobacillus acidophilus* RMK567 isolated from raw milk. *Food Science of Animal Resources*, 29(1), 15-23.
- Lim, S.-M., & Im, D.-S. (2009). Screening and characterization of probiotic lactic acid bacteria isolated from Korean fermented foods. *J. Microbiol. Biotechnol*, 19(2), 178-186.
- Lin, S. Y., Ayres, J. W., Winkler Jr, W., & Sandine, W. E. (1989). Lactobacillus effects on cholesterol: in vitro and in vivo results. *Journal of dairy science*, 72(11), 2885-2899.
- Liong, M.-T. (2011). *Probiotics: biology, genetics and health aspects* (Vol. 21): Springer Science & Business Media.
- Long, S. S., & Swenson, R. M. (1977). Development of anaerobic fecal flora in healthy newborn infants. *The Journal of pediatrics*, 91(2), 298-301.
- Low, D., Ahlgren, J. A., Horne, D., McMahon, D. J., Oberg, C. J., & Broadbent, J. R. (1998). Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(6), 2147-2151.
- Lu, L., & Walker, W. A. (2001). Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *The American journal of clinical nutrition*, 73(6), 1124S-1130S.
- Madaliński, K., & Szajewska, H. (2004). Probiotics: mechanism of action, immunomodulation and potential use in gastrointestinal diseases. *Zakazenia*, 5, 42-48.
- Maldonado, N. C., & Nader, M. E. F. (2015). Functional properties (acid and bile tolerance) and antibiotic susceptibility of lactic acid bacteria isolated from newborn calves for the design of a probiotic product.
- Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16(3), 189-199.
- Marco, M. L., Pavan, S., & Kleerebezem, M. (2006). Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Current opinion in biotechnology*, 17(2), 204-210.
- Marteau, P. (1993). Fate and effects of some transiting microorganisms in the human gastrointestinal tract. *World Rev Nutr Diet*, 74, 1-21.
- Marteau, P. (2001). Safety aspects of probiotic products. *Näringsforskning*, 45(1), 22-24.
- Marteau, P. R., Vrese, M. d., Cellier, C. J., & Schrezenmeir, J. (2001). Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 430s-436s.
- Masco, L., Crockaert, C., Van Hoorde, K., Swings, J., & Huys, G. (2007). In vitro assessment of the gastrointestinal transit tolerance of taxonomic reference strains from human origin and probiotic product isolates of *Bifidobacterium*. *Journal of dairy science*, 90(8), 3572-3578.
- Mathara, J. M., Schillinger, U., Guigas, C., Franz, C., Kutima, P. M., Mbugua, S. K., Shin, H.-K., & Holzapfel, W. H. (2008). Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya. *International Journal of Food Microbiology*, 126(1-2), 57-64.
- Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., & Saarela, M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 173-182.

- McConnell, M., Mercer, A., & Tannock, G. (1991). Transfer of plasmid pAMβ1 between members of the normal microflora inhabiting the murine digestive tract and modification of the plasmid in a *Lactobacillus reuteri* host. *Microbial ecology in Health and Disease*, 4(6), 343-355.
- Metchnikoff, I. (1907). *The Prolongation of Life: Optimistic Studies* Heinemann. Ed GP Putnam and sons. London y UK.
- Mevissen-Verhage, E., Marcelis, J., De Vos, M., Harmsen-van Amerongen, W., & Verhoef, J. (1987). Bifidobacterium, Bacteroides, and Clostridium spp. in fecal samples from breast-fed and bottle-fed infants with and without iron supplement. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(2), 285-289.
- Mogensen, G., & Friis, M. (1997). *L. casei* CRL 431. *The World of Ingr.*
- Mombelli, B., & Gismondo, M. R. (2000). The use of probiotics in medical practice. *International journal of antimicrobial agents*, 16(4), 531-536.
- Moore, W., Cato, E., & Holdeman, L. (1978). Some current concepts in intestinal bacteriology. *The American journal of clinical nutrition*, 31(10), S33-S42.
- Mozzi, F., Vaningelgem, F., Hébert, E. M., Van der Meulen, R., Moreno, M. R. F., de Valdez, G. F., & De Vuyst, L. (2006). Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(6), 4431-4435.
- Nawaz, M., Wang, J., Zhou, A., Ma, C., Wu, X., & Xu, J. (2011). Screening and characterization of new potentially probiotic lactobacilli from breast-fed healthy babies in Pakistan. *Afr. J. Microbiol. Res*, 5(12), 1428-1436.
- Nishimura, J. (2014). Exopolysaccharides Produced from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Advances in Microbiology*, 4(14), 1017.
- Niu, K.-M., Kothari, D., Cho, S.-B., Han, S.-G., Song, I.-G., Kim, S.-C., & Kim, S.-K. (2019). Exploring the probiotic and compound feed fermentative applications of *Lactobacillus plantarum* SK1305 isolated from Korean green chili pickled pepper. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11(3), 801-812.
- Normark, B. H., & Normark, S. (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of internal medicine*, 252(2), 91-106.
- Nueno-Palop, C., & Narbad, A. (2011). Probiotic assessment of *Enterococcus faecalis* CP58 isolated from human gut. *International Journal of Food Microbiology*, 145(2-3), 390-394.
- O'sullivan, M., Thornton, G., O'sullivan, G., & Collins, J. (1992). Probiotic bacteria: myth or reality? *Trends in Food Science & Technology*, 3, 309-314.
- Oberman, H., & Libudzisz, Z. (1998). Fermented milks. In *Microbiology of fermented foods* (pp. 308-350): Springer.
- Oh, Y. J., & Jung, D. S. (2015). Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* and *Pediococcus* strains isolated from Omegisool, a traditionally fermented millet alcoholic beverage in Korea. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1), 437-444.
- Ojetti, V., Gigante, G., Ainora, M., Fiore, F., Barbaro, F., & Gasbarrini, A. (2009). Microflora imbalance and gastrointestinal diseases. *Digestive and Liver Disease Supplements*, 3(2), 35-39.
- Ouoba, L. I. I., Lei, V., & Jensen, L. B. (2008). Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials:

- determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 121(2), 217-224.
- Ouwehand, A., Vankerckhoven, V., Goossens, H., Huys, G., Swings, J., Vancanneyt, M., & Lähteenmäki, A. (2005). The safety of probiotics in foods in Europe and its legislation. *Probiotics in food safety and human health. CRC Press, Boca Raton*, 405-429.
- Ouwehand, A. C., Isolauri, E., Kirjavainen, P. V., & Salminen, S. J. (1999). Adhesion of four Bifidobacterium strains to human intestinal mucus from subjects in different age groups. *FEMS Microbiology Letters*, 172(1), 61-64.
- Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., Shortt, C., & Salminen, S. (1999). Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal*, 9(1), 43-52.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. In *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications* (pp. 279-289): Springer.
- Ouwehand, A. C., & Salminen, S. J. (1998). The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *International Dairy Journal*, 8(9), 749-758.
- Ouwehand, A. C., & Vesterlund, S. (2004). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. *Food Science and Technology - New York - Marcel Dekker*, 139, 375-396.
- Palomba, S., Cavella, S., Torrieri, E., Piccolo, A., Mazzei, P., Blaiotta, G., Ventrino, V., & Pepe, O. (2012). Polyphasic screening, homopolysaccharide composition, and viscoelastic behavior of wheat sourdough from a *Leuconostoc lactis* and *Lactobacillus curvatus* exopolysaccharide-producing starter culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(8), 2737-2747.
- Park, S.-Y., Lee, J.-W., & Lim, S.-D. (2014). The probiotic characteristics and GABA production of *Lactobacillus plantarum* K154 isolated from kimchi. *Food Science and Biotechnology*, 23(6), 1951-1957.
- Patel, A., Prajapati, J., Holst, O., & Ljungh, A. (2014). Determining probiotic potential of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from vegetables and traditional Indian fermented food products. *Food Bioscience*, 5, 27-33.
- Pennacchia, C., Ercolini, D., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G., & Villani, F. (2004). Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat science*, 67(2), 309-317.
- Pereira, D. I., & Gibson, G. R. (2002a). Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(9), 4689-4693.
- Pereira, D. I., & Gibson, G. R. (2002b). Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 37(4), 259-281.
- Petroff, O. A. (2002). *Book review: GABA and glutamate in the human brain* (Vol. 8).
- Pettersson, L., Graf, W., & Sewelin, U. (1983). *Survival of Lactobacillus acidophilus NCDO 1748 in the human gastrointestinal tract, 2: Ability to pass the stomach and intestine in vivo*. Paper presented at the Symposia of the Swedish Nutrition Foundation (Sweden).
- Plant, L., & Conway, P. (2001). Association of *Lactobacillus* spp. with Peyer's patches in mice. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8(2), 320-324.
- Provencher, C., LaPointe, G., Sirois, S., Van Calsteren, M.-R., & Roy, D. (2003). Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of priming

- glycosyltransferase genes of the exopolysaccharide locus in strains of the *Lactobacillus casei* group. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(6), 3299-3307.
- Rajoka, M. S. R., Mehwish, H. M., Siddiq, M., Haobin, Z., Zhu, J., Yan, L., Shao, D., Xu, X., & Shi, J. (2017). Identification, characterization, and probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from human milk. *LWT*, 84, 271-280.
- Ratanaburee, A., Kantachote, D., Charenjiratrakul, W., & Sukhoom, A. (2013). Enhancement of γ -aminobutyric acid (GABA) in Nham (Thai fermented pork sausage) using starter cultures of *Lactobacillus namurensis* NH2 and *Pediococcus pentosaceus* HN8. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), 170-176.
- Ravula, R., & Shah, N. (1998). Effect of acid casein hydrolysate and cysteine on the viability of yogurt and probiotic bacteria in fermented frozen dairy desserts. *Australian Journal of Dairy Technology*, 53(3), 175.
- Reid, G. (1999). The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(9), 3763-3766.
- Reuter, G. (1965a). Das Vorkommen von Laktobazillen in Lebensmitteln und ihr Verhalten im menschlichen Intestinaltrakt. *Zbl Bakt I Orig*, 197, 468-487.
- Reuter, G. (1965b). Untersuchungen über die Zusammensetzung und die Beeinflussbarkeit der menschlichen Magen- und Darmflora unter besonderer Berücksichtigung der Laktobazillen. *Ernährungsforschung*, 10, 429-435.
- Reuter, G. (1969). Zusammensetzung und Anwendung von Bakterienkulturen für therapeutische Zwecke. *Arzneimittel-Forschung*, 19, 109-109.
- Robredo, B., Singh, K. V., Baquero, F., Murray, B. E., & Torres, C. (2000). Vancomycin-resistant enterococci isolated from animals and food. *International Journal of Food Microbiology*, 54(3), 197-204.
- Rolfe, R. D. (2000). The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *The Journal of nutrition*, 130(2), 396S-402S.
- Rosenberg, M., Gutnick, D., & Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, 9(1), 29-33.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., & Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 163-171.
- Ruszczyński, M., Radzikowski, A., & Szajewska, H. (2008). Clinical trial: effectiveness of *Lactobacillus rhamnosus* (strains E/N, Oxy and Pen) in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 28(1), 154-161.
- Ryan, P., Ross, R., Fitzgerald, G., Caplice, N., & Stanton, C. (2015). Sugar-coated: exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications. *Food & function*, 6(3), 679-693.
- S, S., Bouley, C., Boutron, M.-C., Cummings, J., Franck, A., Gibson, G., Isolauri, E., Moreau, M.-C., Roberfroid, M., & Rowland, I. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*, 80(S1), S147-S171.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of biotechnology*, 84(3), 197-215.

- Saavedra, J. M., Bauman, N. A., Perman, J., Yolken, R. H., & Oung, I. (1994). Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *The Lancet*, *344*(8929), 1046-1049.
- Salminen, E., Elomaa, I., Minkkinen, J., Vapaatalo, H., & Salminen, S. (1988). Preservation of intestinal integrity during radiotherapy using live *Lactobacillus acidophilus* cultures. *Clinical radiology*, *39*(4), 435-437.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M. C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., Isolauri, E., Moreau, M. C., Roberfroid, M., & Rowland, I. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr*, *80 Suppl 1*, S147-171. doi:10.1079/bjn19980108
- Salminen, S., Isolauri, E., & Salminen, E. (1996a). Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *70*(2-4), 347-358.
- Salminen, S., Isolauri, E., & Salminen, E. (1996b). Probiotics and stabilisation of the gut mucosal barrier. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, *5*, 53-56.
- Salminen, S., Laine, M., VONWRIGHT, A., Vuopio-Varkila, J., Korhonen, T., & Mattila-Sandholm, T. (1996). Development of selection criteria for probiotic strains to assess their potential in functional foods: a Nordic and European approach. *Bioscience and Microflora*, *15*(2), 61-67.
- Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., & Lee, Y. (1999). Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Science & Technology*, *10*(3), 107-110.
- Salminen, S., & von Wright, A. (1998). Current probiotics-safety assured? *Microbial ecology in Health and Disease*, *10*(2), 68-77.
- Sanders, M. E. (2003). Probiotics: considerations for human health. *Nutrition reviews*, *61*(3), 91-99.
- Sanni, A., Onilude, A., Ogunbanwo, S., & Smith, S. (1999). Antagonistic activity of bacteriocin produced by *Lactobacillus* species from ogi, an indigenous fermented food. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, *39*(3), 189-195.
- Sarowska, J., Choroszy-Król, I., Regulska-Ilow, B., Frej-Madrzak, M., & Jama-Kmiecik, A. (2013). The therapeutic effect of probiotic bacteria on gastrointestinal diseases. *Adv Clin Exp Med*, *22*(5), 759-766.
- Sartor, R. B. (2008). Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, *134*(2), 577-594.
- Scheinbach, S. (1998). Probiotics: functionality and commercial status. *Biotechnology Advances*, *16*(3), 581-608.
- Schiffrin, E., Rochat, F., Link-Amster, H., Aeschlimann, J., & Donnet-Hughes, A. (1995). Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *Journal of dairy science*, *78*(3), 491-497.
- Schillinger, U., Guigas, C., & Holzapfel, W. H. (2005). In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *International Dairy Journal*, *15*(12), 1289-1297.
- Schuler-Malyoth, R., Ruppert, A., & Müller, F. (1968). Die Mikroorganismen der Bifidusgruppe (syn. *Lactobacillus bifidus*). 2. Mitteilung: Die Technologie der Bifiduskultur im milchverarbeitenden Betrieb. *Milchwissenschaft*, *23*, 554-558.

- Scott, P. (1990). Mycotoxigenic fungal contaminants of cheese and other dairy products.
- Seddik, H. A., Bendali, F., Cudennec, B., & Drider, D. (2017). Anti-pathogenic and probiotic attributes of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum* strains isolated from feces of Algerian infants and adults. *Research in Microbiology*, 168(3), 244-254.
- Servin, A. L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology reviews*, 28(4), 405-440.
- Shahani, K. M., & Ayebo, A. D. (1980). Role of dietary lactobacilli in gastrointestinal microecology. *American Journal of Clinical Nutrition*, 33(11, Supplement), 2448-2457.
- Sharma, K., Sharma, N., & Sharma, R. (2016). Identification and evaluation of in vitro probiotic attributes of novel and potential strains of lactic acid bacteria isolated from traditional dairy products of North-West Himalayas. *J Clin Microbiol Biochem Technol*, 2(1), 018.
- Singer, R. S., Ward, M. P., & Maldonado, G. (2006). Can landscape ecology untangle the complexity of antibiotic resistance? *Nature reviews microbiology*, 4(12), 943-952.
- Singh, T. P., Kaur, G., Malik, R. K., Schillinger, U., Guigas, C., & Kapila, S. (2012). Characterization of intestinal *Lactobacillus reuteri* strains as potential probiotics. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 4(1), 47-58.
- Singh, V. A., & Bunger, R. (2014). Probiotics and gut health. *J. Int. Med. Sci. Acad*, 27(1), 41-43.
- Smitinont, T., Tansakul, C., Tanasupawat, S., Keeratipibul, S., Navarini, L., Bosco, M., & Cescutti, P. (1999). Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional Thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. *International Journal of Food Microbiology*, 51(2-3), 105-111.
- Soghomonian, J.-J., & Martin, D. L. (1998). Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends in pharmacological sciences*, 19(12), 500-505.
- St-Onge, M.-P., Farnworth, E. R., & Jones, P. J. (2000). Consumption of fermented and nonfermented dairy products: effects on cholesterol concentrations and metabolism. *The American journal of clinical nutrition*, 71(3), 674-681.
- Stolz, P. (1999). Mikrobiologie des sauersteiges. *Handbuch Sauersteig: Biologie, Biochemie, Technologie*, 35-60.
- Şentürk, D. Z., Dertli, E., Erten, H., & Şimşek, Ö. (2020). Structural and technological characterization of ropy exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Tarhana. *Food Science and Biotechnology*, 29(1), 121-129.
- Tahri, K., Crociani, J., Ballongue, J., & Schneider, F. (1995). Effects of three strains of bifidobacteria on cholesterol. *Letters in Applied Microbiology*, 21(3), 149-151.
- Tahri, K., Grill, J. P., & Schneider, F. (1997). Involvement of trihydroxyconjugated bile salts in cholesterol assimilation by bifidobacteria. *Current microbiology*, 34(2), 79-84.
- Tanaka, R. (1996). *The effects of the ingestion of fermented milk with Lactobacillus casei Shirota on the gastrointestinal microbial ecology in healthy subjects*. Paper presented at the International Congress and Symposium Series 219.
- Tang, P., Foubister, V., Pucciarelli, M. G., & Finlay, B. B. (1993). Methods to study bacterial invasion. *Journal of microbiological methods*, 18(3), 227-240.
- Tannock, G. W. (1995). *Normal microflora: an introduction to microbes inhabiting the human body*: Springer Science & Business Media.

- Tannock, G. W. (1997). Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. *Trends in biotechnology*, 15(7), 270-274.
- Tannock, G. W. (1999). Modification of the normal microflora. In *Medical importance of the normal microflora* (pp. 487-506): Springer.
- Tannock, G. W., Fuller, R., Smith, S., & Hall, M. (1990). Plasmid profiling of members of the family Enterobacteriaceae, lactobacilli, and bifidobacteria to study the transmission of bacteria from mother to infant. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(6), 1225-1228.
- Tao, Y., Drabik, K. A., Waypa, T. S., Musch, M. W., Alverdy, J. C., Schneewind, O., Chang, E. B., & Petrof, E. O. (2006). Soluble factors from *Lactobacillus GG* activate MAPKs and induce cytoprotective heat shock proteins in intestinal epithelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 290(4), C1018-C1030.
- Taranto, M., Fernandez Murga, M., Lorca, G., & de Valdez, G. F. (2003). Bile salts and cholesterol induce changes in the lipid cell membrane of *Lactobacillus reuteri*. *Journal of applied microbiology*, 95(1), 86-91.
- Teuber, M., Meile, L., & Schwarz, F. (1999). Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. In *Lactic acid bacteria: Genetics, metabolism and applications* (pp. 115-137): Springer.
- Tieking, M., & Gänzle, M. G. (2005). Exopolysaccharides from cereal-associated lactobacilli. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1-3), 79-84.
- Tieking, M., Kaditzky, S., Valcheva, R., Korakli, M., Vogel, R. F., & Gänzle, M. G. (2005). Extracellular homopolysaccharides and oligosaccharides from intestinal lactobacilli. *Journal of applied microbiology*, 99(3), 692-702.
- Tieking, M., Korakli, M., Ehrmann, M. A., Gänzle, M. G., & Vogel, R. F. (2003). In situ production of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(2), 945-952.
- Tokunaga, T., Oku, T., & Hosoya, N. (1986). Influence of chronic intake of new sweetener fructooligosaccharide (Neosugar) on growth and gastrointestinal function of the rat. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 32(1), 111-121.
- Tuberoso, C. I. G., Congiu, F., Serreli, G., & Mameli, S. (2015). Determination of dansylated amino acids and biogenic amines in Cannonau and Vermentino wines by HPLC-FLD. *Food chemistry*, 175, 29-35.
- Tulumoglu, S., Yuksekdog, Z. N., Beyatli, Y., Simsek, O., Cinar, B., & Yaşar, E. (2013). Probiotic properties of lactobacilli species isolated from children's feces. *Anaerobe*, 24, 36-42.
- Tung, Y. T., Lee, B. H., Liu, C. F., & Pan, T. M. (2011). Optimization of culture condition for ACEI and GABA production by lactic acid bacteria. *Journal of Food Science*, 76(9), M585-M591.
- Tuomola, E., Ouwehand, A., & Salminen, S. (1999). Human ileostomy glycoproteins as a model for small intestinal mucus to investigate adhesion of probiotics. *Letters in Applied Microbiology*, 28(3), 159-163.
- Tuomola, E. M., & Salminen, S. J. (1998). Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 41(1), 45-51.
- Van Geel-Schutten, G., Flesch, F., Ten Brink, B., Smith, M., & Dijkhuizen, L. (1998). Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. *Applied microbiology and biotechnology*, 50(6), 697-703.

- Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2008). Probiotics—from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18(7), 714-728.
- Velraeds, M., Van der Mei, H., Reid, G., & Busscher, H. J. (1996). Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(6), 1958-1963.
- Venkadesan, D., & Sumathi, V. (2015). Screening of lactic acid bacteria for their antibacterial activity against milk borne pathogens. *International journal of applied research*, 1, 970-973.
- Ventorino, V., Pepe, O., Piccolo, A., Mazzei, P., & Blaiotta, G. (2012). Simona Palomba, Silvana Cavella, Elena Torrieri.
- Verdenelli, M. C., Ghelfi, F., Silvi, S., Orpianesi, C., Cecchini, C., & Cresci, A. (2009). Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. *European journal of nutrition*, 48(6), 355-363.
- Villegas, J. M., Brown, L., de Giori, G. S., & Hebert, E. M. (2016). Optimization of batch culture conditions for GABA production by *Lactobacillus brevis* CRL 1942, isolated from quinoa sourdough. *LWT-Food Science and Technology*, 67, 22-26.
- Vinderola, C. G., & Reinheimer, J. A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36(9-10), 895-904.
- Vinderola, G., Perdigón, G., Duarte, J., Farnworth, E., & Matar, C. (2006). Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* on the gut mucosal immunity. *Cytokine*, 36(5-6), 254-260.
- Vizoso Pinto, M. G., Schuster, T., Briviba, K., Watzl, B., Holzapfel, W. H., & Franz, C. M. (2007). Adhesive and chemokine stimulatory properties of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *Journal of Food Protection*, 70(1), 125-134.
- Vogelsang, H., Ferenci, P., & Gangl, A. (1987). Die Laktoseintoleranz. *Lactose intolerance.) Ernährung*, 11, 339-343.
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R., & Ivanova, E. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, 14(7), 2535-2554.
- Vuyst, D., & de Ven, V. (1998). Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *Journal of applied microbiology*, 84(6), 1059-1068.
- Wall, T., Båth, K., Britton, R. A., Jonsson, H., Versalovic, J., & Roos, S. (2007). The early response to acid shock in *Lactobacillus reuteri* involves the ClpL chaperone and a putative cell wall-altering esterase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(12), 3924-3935.
- Walter, J., Schwab, C., Loach, D. M., Gänzle, M. G., & Tannock, G. W. (2008). Glucosyltransferase A (GtfA) and inulosucrase (Inu) of *Lactobacillus reuteri* TMW1. 106 contribute to cell aggregation, in vitro biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Microbiology*, 154(1), 72-80.
- Wan, L., Chen, Z., Shah, N., & El-Nezami, H. (2016). Modulation of intestinal epithelial defense responses by probiotic bacteria. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(16), 2628-2641.
- Wang, B., Wei, H., Yuan, J., Li, Q., Li, Y., Li, N., & Li, J. (2008). Identification of a surface protein from *Lactobacillus reuteri* JCM1081 that adheres to porcine gastric mucin and human enterocyte-like HT-29 cells. *Current microbiology*, 57(1), 33-38.

- Wang, C.-Y., Lin, P.-R., Ng, C.-C., & Shyu, Y.-T. (2010). Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe*, *16*(6), 578-585.
- Wang, J., Zhang, H., Chen, X., Chen, Y., & Bao, Q. (2012). Selection of potential probiotic lactobacilli for cholesterol-lowering properties and their effect on cholesterol metabolism in rats fed a high-lipid diet. *Journal of dairy science*, *95*(4), 1645-1654.
- Wang, S.-M., Zhang, L.-W., Fan, R.-B., Han, X., Yi, H.-X., Zhang, L.-L., Xue, C.-H., Li, H.-B., Zhang, Y.-H., & Shigwedha, N. (2014). Induction of HT-29 cells apoptosis by lactobacilli isolated from fermented products. *Research in Microbiology*, *165*(3), 202-214.
- Watanabe, T., Morotomi, M., Kawai, Y., & Mutai, M. (1977). Reduction of population levels of some indigenous bacteria by lactobacilli in the gastrointestinal tract of gnotobiotic rats. *Microbiology and immunology*, *21*(9), 495-503.
- Wolupeck, H. L., Morete, C. A., DallaSanta, O. R., Luciano, F. B., Madeira, H. M. F., & Macedo, R. E. F. d. (2017). Methods for the evaluation of antibiotic resistance in *Lactobacillus* isolated from fermented sausages. *Ciência Rural*, *47*(8).
- Xanthopoulos, V., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Tzanetakis, N. (2000). Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant faeces as dietary adjuncts. *Food Microbiology*, *17*(2), 205-215.
- Yalçınkaya, S., Kılıç, G. B., & Çakmakçı, A. G. K. (2019). The Importance of Gamma Aminobutyric Acid Produced by Lactic Acid Bacteria. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, *7*(8), 1094-1099.
- Yan, F., & Polk, D. B. (2002). Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *Journal of biological chemistry*, *277*(52), 50959-50965.
- Yang, R., & Ray, B. (1994). Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, *11*(4), 281-291.
- Yasuda, E., Serata, M., & Sako, T. (2008). Suppressive effect on activation of macrophages by *Lactobacillus casei* strain Shirota genes determining the synthesis of cell wall-associated polysaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.*, *74*(15), 4746-4755.
- Zangeneh, M., Khaleghi, M., & Khorrami, S. (2019). Isolation of *Lactobacillus plantarum* Strains With Robust Antagonistic Activity, Qualified Probiotic Properties, and Without Antibiotic-resistance From Traditional Sourdough. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, *6*(2), 66-74.
- Zhang, Y., Zhang, L., Du, M., Yi, H., Guo, C., Tuo, Y., Han, X., Li, J., Zhang, L., & Yang, L. (2011). Antimicrobial activity against *Shigella sonnei* and probiotic properties of wild lactobacilli from fermented food. *Microbiological research*, *167*(1), 27-31.
- Zhou, J., Pillidge, C., Gopal, P., & Gill, H. (2005). Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, *98*(2), 211-217.

EKLER

EK-1. Bakteri Gelişiminde Kullanılan Besiyerleri

MRS (Man Rogosa and Sharpe) Broth (Merck 1.10661) (g/L)	
Kimyasallar	Miktar
Kazein pepton	10.0 g
Et ekstratı	8.0 g
Maya ekstratı	4.0 g
D(+) Glukoz	20.0 g
Di-potasyum hidrojen fosfat	2.0 g
Tween 80	1 ml
Di-amonyum hidrojen sitrat	2.0 g
Sodyum asetat	5.0 g
Magnezyum sülfat	0.2 g
Mangan sülfat	0.04 g

Besiyeri 52.2 g/L olacak şekilde damıtık su içinde eritilip otoklavda 121°C de 15 dk sterilize edilmiştir.

MRS (Man Rogosa and Sharpe) Agar (Merck 1.10660) (g/L)	
Kimyasallar	Miktar
Kazein pepton	10.0 g
Et ekstratı	8.0 g
Maya ekstratı	4.0 g
D(+) Glukoz	20.0 g
Di-potasyum hidrojen fosfat	2.0 g
Tween 80	1 ml
Di-amonyum hidrojen sitrat	2.0 g
Sodyum asetat	5.0 g
Magnezyum sülfat	0.2 g
Mangan sülfat	0.04 g
Agar-agar	15.0 g

Dehidre besiyeri 68.2 g/L olacak şekilde damıtık su içerisinde çözündürülüp otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir. 45°C'ye kadar soğutularak petri plaklarına dökülmüş ve dondurularak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Brain Heart Infusion (BHI) broth (g/L) (Biolife)	
Kimyasallar	Miktar
Beyin kalp infüzyonu (katı)	17.5 g
Karışık pepton	10.0 g
Glukoz	2.0 g
Sodyum klorür	5.0 g
Disodyum hidrojen fosfat	2.5 g

Besiyeri 37.0 g/L olacak şekilde distile su ile süspansiyon edilmiştir. Çözündürülen süspansiyon otoklavda 121°C de 15 dk sterilize edilmiştir. Son pH 7.4 ± 0,2 olmaktadır.

Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck 1.10130) (g/L)	
Kimyasallar	Miktar
Patates infüzyonu	4.0 g
Glukoz	20.0 g
Agar-agar	15.0 g

Tryptic soy broth (TSB) (Merck 1.05459) (g/L)	
Kimyasallar	Miktar
Kazeinden pepton	15.0 g
Soya unundan pepton	5.0 g
NaCl	5.0 g

Tryptic soy agar (TSA) (Merck 1.05458) (g/L)	
Kimyasallar	Miktar
Kazeinden pepton	15.0 g
Soya unundan pepton	5.0 g
NaCl	5.0 g
Agar-agar	15.0 g

Blood Agar Base (Merck 1.10886) (g/L)	
Kimyasallar	Miktar
Kalp ekstratı ve peptonlar	20.0 g
NaCl	5.0 g
Agar-agar	15.0 g

Dehidre besiyeri 40 g/L konsantrasyonda olacak şekilde 121°C de 15 dk sterilize edildikten sonra 45°C'ye soğutulmuş %7 oranında kan ilave edilip karıştırılmıştır. Bu işlemden hemen sonra petri kutularına yaklaşık 20 mL dökülerek hazır hale getirilmiştir.

Modifiye sukrozlu BHI (g/L)	
Bileşim	Miktar
BHI Broth	37 g
Kazeinden pepton	5 g
Et ekstratı	5 g
Sodyum asetat	5 g
Sukroz	30 g
Magnezyum sülfat heptahidrat	0.2 g
Tween 80	1 ml

%0.8 Yumuşak PDA	
Bileşim	Miktar (g/L)
Agar-agar	8 g
Kazeinden pepton	10 g
Maya ekstratı	10 g
Glukoz	20 g

EK-2. Çalışmada Kullanılan Tampon ve Bileşimleri

1M Tris buffer (pH 8)	
Bileşim	Miktar (g/L)
TRIZMA-Base (Sigma)	121.11
Distile su	1 L'ye tamalanır

0.5 M EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit) (pH 8)	
Bileşim	Miktar (g/L)
EDTA (Sigma)	146.12
Distile su	1 L'ye tamalanır

TE buffer (10mM Tris HCl, 1mM EDTA, pH 8)	
Bileşim	Miktar (mL)
1M Tris pH 8	5 mL
0.5 M EDTA pH 8	1 mL
Distile su	494 mL

10X TBE (Tris Borat EDTA)	
Bileşim	Miktar (g/L)
Tris base	108
Borik asit	55
EDTA	7.5
Distile su	1 L'ye tamamlanır

Kimyasal maddelerin hepsi tartılıp bir şişeye koyulduktan sonra 1 litre distile su içinde çözülmüştür. İyice çözünen karışımın pH'sı 8.4'e ayarlanarak çözelti hazır hale getirilmiştir.

0.5X TBE TAMPONU pH 8.4

10X TBE çözeltisinden 50 ml alınıp saf suyla 1 litreye tamamlanarak hazırlanmıştır. Agaroz jelin hazırlanması ve jele yüklenen PCR amplikonlarının yürütülmesinde kullanılmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

1 Ekim 1996 yılında Gümüşhane ili Şiran ilçesinde doğdu. Lise öğrenimini Şiran Şehit Teğmen Tuna Kara Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2014 yılında Bayburt Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde başladığı öğrenimini 2018 yılında bitirdi. Aynı yıl Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Bölümünde yüksek lisansa başladı.

