***Enterococcus faecium, Lactococccus lactis* ve *Lactobacillus casei'* NİN PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN VE FİTAZ AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

Yusuf Can ORMAN

Yüksek Lisans Tezi

Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı

2023

(Her hakkı saklıdır)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

Enterococcus faecium, Lactococccus lactis ve *Lactobacillus casei'* NİN PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN VE FİTAZ AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

(Determination of Probiotic Properties and Phytase Activities of *Enterococcus faecium, Lactococccus lactis* and *Lactobacillus casei*)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yusuf Can ORMAN

Danışman: Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ

Erzurum

Haziran, 2023

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Natural and Applied Sciences

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü
TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

***Enterococcus faecium, Lactococccus lactis ve Lactobacillus casei'* nin Probiyotik Özelliklerinin ve Fitaz Aktivitelerinin Belirlenmesi**

Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ danışmanlığında, Yusuf Can ORMAN tarafından hazırlanan bu çalışma, 21/06/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Doç. Dr. Kenan KARAGÖZ Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ Atatürk Üniversitesi	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Dr. Öğr. Üyesi Merve ŞENOL KOTAN Atatürk Üniversitesi	Aslı Islak İmzalıdır

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

Prof.Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN
Enstitü Müdürü
Aslı Islak İmzalıdır

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2022-10137

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Natural and Applied Sciences

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ danışmanlığında sunulan "*Enterococcus faecium, Lactococccus lactis ve Lactobacillus casei 'nin Probiyotik Özelliklerinin ve Fitaz Aktivitelerinin Belirlenmesi*" başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	**24**	**30**
Kuramsal Temeller	**28**	**30**
Materyal ve Metot	**27**	**35**
Araştırma Bulguları ve Tartışma	**2**	**20**
Sonuçlar ve Öneriler	**7**	**20**
Tezin Geneli	**12**	**25**

Not: *Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının* ***%5'den*** *büyük olmaması gerekir.*

Sunulan bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ettiğimizi beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	**Tez Danışmanı**
Yusuf Can ORMAN	Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ
21.6.2023	**21.6.2023**
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

***** Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun …./…/…. tarih ve ……. sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun …./…/…. tarih ve ……. sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

Not: Bu form, Tezin son şekline uygun olarak bilgisayar ortamında doldurulmalı, çıktısı imzalanıp Tezin sonuna eklenmelidir.

TEŞEKKÜR

Bütün çalışmalarım süresince anlayışını, sabrını ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve deneyimleri ile bu yolda bana öncü olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ'a,

Tüm laboratuvar çalışmalarım ve tez yazım aşamasında sabır, destek ve anlayışlarından dolayı meslektaşlarım doktora öğrencileri Sevda UÇAR ve Şeyma ALIM'a,

Tez çalışmamı, FYL-2022-10137 nolu proje koduyla destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri koordinatörlüğü'ne,

Laboratuvar çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Tarımsal Biyoteknoloji Laboratuvarları Koordinatörlüğü'ne ve

Aileme maddi ve manevi desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Yusuf Can ORMAN

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Enterococcus faecium, Lactococccus lactis ve *Lactobacillus casei* 'NİN PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN ve FİTAZ AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Yusuf Can ORMAN

Danışman: Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ

Amaç: Süt ve süt ürünlerinden izole edilen bakterilerin (*Enterococcus faecium, Lactobacillus lactis* ve *Lactobacillus casei*) probiyotik olma özelliklerinin belirlenmesi ve fitaz enzimini üretebilme kapasitelerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu çalışmada; *E. faecium* (kaynağı: köy tipi beyaz peynir), *L. lactis* (kaynağı: yoğurt) ve *L. case*i'nin (kaynağı: köy sütü) asit ve yüksek safra tuzu konsantrasyonlarına dirençliliği, safra tuzu hidrolizi, antimikrobiyal aktiviteleri, bazı patojen mikroorganizmalara karşı antagonostik etkileri, bakteriosin veya bakteriosin benzeri maddelerin inhibitör etkileri, pepsine karşı gelişimleri, pankreatine karşı gelişimleri, lizozim toleransları, fenol dirençleri, otoagregasyon-koagregasyon özellikleri ve fitaz enzimi aktiviteleri belirlenmiştir.

Bulgular: Farklı safra tuzu konsantrasyonlarında (%0,3, %0,5, %1,0 ve %1,5) *E. faecium* ve *L. lactis* canlılığını korurken, *L. casei* %1 ve 1,5'te canlılık göstermemiştir. *L. lactis* ve L. *casei*'nin safra tuzunu hidrolize edebildiği belirlenmiştir. Her üç suşun lizozim fenol ve pankreatine toleranslı olduğu belirlenmiştir. E. *faecium* ve *L. casei* pepsin varlığında pH 3,0'te sırasıyla %14' ve %10'luk bir hayatta kalma oranı sergilemiştir. E. *faecium*'un gentamicin, meropenem ve bacitracine, *L. lactis*'in gentamicin ve rifampine, *L. casei*'nin ise vancomycin, teicoplanin, gentamicin ve ceflazidime dirençli olduğu tespit edilmiştir. *E. faecium, B. cereus* dışında tüm patojenlere karşı inhibitör etki gösterirken, diğer suşlar zayıf bir etki oluşturmuştur. Bakteriosin veya bakteriosin benzeri madde uygulamasında; *L. casei*'nin süpernatantı *S. enteritidis* (RK-485), *B. cereus* ve *E. faecalis* (RK-487)'e karşı güçlü bir etki göstermiştir. Suşların oto-agregasyon yüzdesi 5 saatlik inkübasyondan sonra sırasıyla % 97, %39,13 ve % 57,14 olarak belirlenmiştir. Ayrıca tüm suşlar *E. coli* ile ko-agregasyon göstermiştir. Sindirim sistemi modellemesi uygulamasında pH 3'te 0-3. saatte tüm suşlar canlılık gösterirken pH 8' de 0-3. saatte sadece *L. lactis* %9 oranında canlılık göstermiştir. Fitaz aktivitesi en yüksek suş *L. lactis* olarak belirlenmiştir.

Sonuç: Suşların probiyotik olabilme ve enzim üretebilme potansiyelleri değerlendirilmiş ve incelenen her bir suşun probiyotik özelliklere sahip olduğu ve ticari olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Probiyotik, Enterococcus faecium, Lactobacillus lactis, Lactobacillus casei, fitaz

Haziran 2023, 58 sayfa

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

DETERMINATION OF PROBIOTIC PROPERTIES AND PHYTASE ACTIVITIES OF *Enterococcus faecium, Lactococccus lactis* AND *Lactobacillus casei*

Yusuf Can ORMAN

Supervisor: Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ

Objective: It was aimed to determine the probiotic properties of bacteria (*Enterococcus faecium, Lactobacillus lactis* and *Lactobacillus casei*) isolated from milk and milk products and to determine their capacity to produce phytase enzyme.

Method: In this study; Resistance of *E. faecium* (source: village type feta cheese), *L. lactis* (source: yogurt) and *L. casei* (source: village milk) to acid and high bile salt concentrations, bile salt hydrolysis, antimicrobial activities, antagonistic effects against some pathogenic microorganisms, Inhibitory effects of bacteriocin or bacteriocin-like substances, development against pepsin, development against pancreatin, lysozyme tolerance, phenol resistance, autoaggregation-coaggregation properties and phytase enzyme activities were determined.

Results: *E. faecium* and *L. lactis* were viable at different bile salt concentrations (0.3%, 0.5%, 1.0% and 1.5%), while *L. casei* was not viable at 1 and 1.5%. *L. lactis* and *L. casei* were found to be able to hydrolyse bile salt. All three strains were found to be tolerant to lysozyme phenol and pancreatin. *E. faecium* and *L. casei* exhibited a survival rate of 14% and 10%, respectively, at pH 3.0 in the presence of pepsin. *E. faecium* was resistant to gentamicin, meropenem and bacitracin, *L. lactis* to gentamicin and rifampin, *L. casei* to vancomycin, teicoplanin, gentamicin and ceflazidime. *E. faecium* showed inhibitory effect against all pathogens except *B. cereus*, while other strains showed a weak effect. In bacteriocin or bacteriocin-like substance treatment, the supernatant of *L. casei* showed a strong effect against *S. enteritidis* (RK-485), *B. cereus* and *E. faecalis* (RK-487). The percentage of auto-aggregation of the strains was determined as 97%, 39.13% and 57.14% after 5 hours of incubation, respectively. In addition, all strains showed co-aggregation with *E. coli*. In the digestive system modelling application, while all strains showed viability at pH 3 at 0-3 h, only *L. lactis* showed 9% viability at pH 8 at 0-3 h. The highest phytase activity was determined as *L. lactis*.

Conclusion: The probiotic and enzyme production potentials of the strains were evaluated and it was concluded that each of the strains examined had probiotic properties and could be commercially evaluated.

Keywords: Probiotic, *Enterococcus faecium, Lactobacillus lactis, Lactobacillus casei*, phytase

Jun 2023, 58 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU ii
TEŞEKKÜR iii
ÖZET iv
ABSTRACT v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR DİZİNİ viii
ŞEKİLLER DİZİNİ ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ x
GİRİŞ 1
KURAMSAL TEMELLER 6
MATERYAL VE METOT 14
Materyal 14
Çalışmada Kullanılan Alet ve Ekipmanlar 14
Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler 14
Metod 15
Bakterilerin Geliştirilmesi 15
Suşların Probiyotik Özelliklerinin İn Vitro Koşullarda Belirlenmesi 15
Asit dirençliliğinin belirlenmesi 15
Safra tuzuna toleransın belirlenmesi 15
Pepsin direncinin belirlenmesi 16
Pankreatin direncinin belirlenmesi 16
Lizozim toleransının belirlenmesi 16
Fenol toleransının belirlenmesi 16
Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi 16
Bazı patojen mikroorganizmalara karşı antagonostik etkilerin belirlenmesi 16
Bakteriosin/ bakteriosin benzeri metabolitlerin inhibitör etkisi 17
Otoagregasyon özelliklerinin belirlenmesi 17
Koagregasyon özelliklerinin belirlenmesi 17
Sindirim sistemi modellemesi 18
Fitaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi 18
Canlı bakteri sayımı 18
ARAŞTIRMA BULGULARI 20

Suşların probiyotik özelliklerinin in vitro koşullarda belirlenmesi 20
Asit dirençliliğinin belirlenmesi 20
Safra tuzuna toleransın belirlenmesi 20
Pepsine karşı gelişimin belirlenmesi 21
Pankreatine karşı gelişimin belirlenmesi 21
Lizozim toleransının belirlenmesi 22
Fenol direncinin belirlenmesi 22
Bakterilerin antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının belirlenmesi 23
Bazı patojen mikroorganizmalara karşı antagonostik etkilerin belirlenmesi 24
Bakteriosin veya bakteriosin benzeri maddelerin inhibitör etkisinin belirlenmesi 24
Otoagregasyon ve koagregasyon özelliklerinin belirlenmesi 25
Sindirim sistemi modellemesi 25
Bakterilerin fitaz aktivitesinin belirlenmesi 26
TARTIŞMA VE SONUÇ 27
KAYNAKÇA 36
ÖZGEÇMİŞ 46

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Asidik Ortamda 20
Tablo 2. Farklı Safra Tuzu Konsantrasyonuna Karşı Bakterilerin % Canlılık Oranları 21
Tablo 3. Pepsine Karşı İzolatların Canlılık Oranları 21
Tablo 4. Pankreatine Karşı İzolatların Canlılık Oranları 22
Tablo 5. Lizozim Enzimine Karşı İzolatların Canlılık Oranları 22
Tablo 6. Fenole Karşı İzolatların Canlılık Oranları 23
Tablo 7. İzolatların 13 Farklı Antibiyotiğe Karşı Göstermiş Oldukları Zon Değerleri 23
Tablo 8. İzolatların Bazı Patojen Mikroorganizmalara Karşı Antagonostik Etkileri 24
Tablo 9. Bakteriosin veya Bakteriosin Benzeri Maddelerin İnhibitör Etkisi 25
Tablo 10. İzolatların Otoagregasyon ve Koagregasyon Yüzdeleri 25
Tablo 11. Sindirim Sistemi Modelinde İzolatların Canlılık Yüzdesi 26

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. İdeal probiyotik özellikleri 3
Şekil 2. Bakterilerin fitaz aktivite sonuçları 26

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

% : Yüzde

°C : Santigrat derece

µL : Mikrolitre

A : Absorbans

CFU : Colony Forming Unit

dk : Dakika

EU/mL : Enzim Ünitesi/mililitre

g : Gram

HCl : Hidroklorik asit

KDa : Kilodalton

L : Litre

LAB : Laktik Asit Bakterisi

M : Molar

mg : Miligram

mL : Mililitre

mM : Milimolar

NaCl : Sodyum Klorür

NaOH : Sodyum hidroksit

NCCLS : Clinical and Laboratory Standards Institute

nm : Nanometre

PBS : Phosphate Buffered Saline

rpm : Dakikada devir sayısı

s : Saat

TCA : Trikloroasetik Asit

GİRİŞ

Probiyotik terimi, “yaşam için” anlamına gelen Yunanca bir kelimeden türetilmiş ve yeterli miktarda tüketildiklerinde simbiyotik yaşam sürdükleri konakçısının sağlığı üzerinde olumlu etkiler gösteren, patojenik olmayan canlı mikroorganizmaları tanımlanmak için kullanılmaktadır (Salvetti *et al.* 2016). "Probiyotikler" terimi ilk olarak Vergin tarafından antibiyotiklerin ve diğer mikrobiyal maddelerin bağırsak mikrobiyal popülasyonu üzerindeki zararlı etkilerini incelerken ortaya atılmış (Vergin 1954) ve daha sonra Lilly ve Stillwell tarafından “Bir mikroorganizma tarafından üretilen ve başka bir mikroorganizmanın büyümesini uyaran bir ürün” olarak yeniden tanımlanmıştır (Lilly and Stillwell 1965). Daha sonra terim, Fuller tarafından “Yutulduğunda konağın sağlığı veya fizyolojisi üzerinde olumlu bir etki gösteren, patojenik olmayan mikroorganizmalar” olarak tanımlanmıştır (Fuller 1989; Pandey *et al.* 2015). Probiyotiğin modern tanımı ise, hayvan veya insana uygulandığında yerli floranın özelliklerini iyileştirerek konakçıyı olumlu bir şekilde etkileyen canlı mikroorganizma kültürü olarak ifade edilmiştir (Aljaloud *et al.* 2020).

Probiyotik üretiminde kullanılan mikroorganizmalar FDA tarafından GRAS (Güvenli Olarak Kabul Edilen) olarak tanımlanmış mikroorganizmalardır (Lee and Salminen 2009). Probiyotik olarak kullanılan en yaygın mikroorganizmalar laktik asit bakterileri (LAB)’dir (Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro 2010). Ancak *Bacillus* ve bazı maya suşları da uygun adaylar olarak tespit edilmiştir. Probiyotikler konağın bağışıklık sistemini güçlendirirken zararlı mikroorganizmalara karşı organizmanın korunmasında rol oynarlar (Gueimonde and Salminen 2006).

LAB, metabolik aktiviteler sırasında yan ürün olarak laktik asit üreten, katalaz negatif, gram pozitif, sitokrom içermeyen, spor oluşturmayan, nitratı indirgemeyen, laktat kullanmayan ve fakültatif anaerob olarak karakterize edilen önemli mikroorganizmalardır (Mora-Villalobos e*t al.* 2020). LAB, *Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Bifidobacterium, Pediococcus, Streptococcus, Enterococcus, Aerococcus, Tetragenecoccus, Vagococcus* ve *Carnobacterium* cinslerini içeren dokuz temel gruptur (Erkmen 2021). LAB’leri gelişme sıcaklıklığı açısından termofil özellikle mezofil grupta bulunmaktadır. Genellikle 10-40°C arasında gelişme gösterirler, optimum 25 ile 35°C arasında gelişirler. Çoğu LAB’i pH 4-8 aralığında gelişmektedir. Bazıları ise 3,2 gibi düşük ve 9,6 gibi yüksek pH değerlerinde gelişebilmektedir. Optimum pH değerleri pH 5,5-5,8’dir. Yüksek tuz yoğunluklarında gelişme, asiti veya alkaliyi tolere etme yeteneklerine sahiptirler. Düşük pH değerlerine karşı toleranslıdırlar. Bu özellikleri

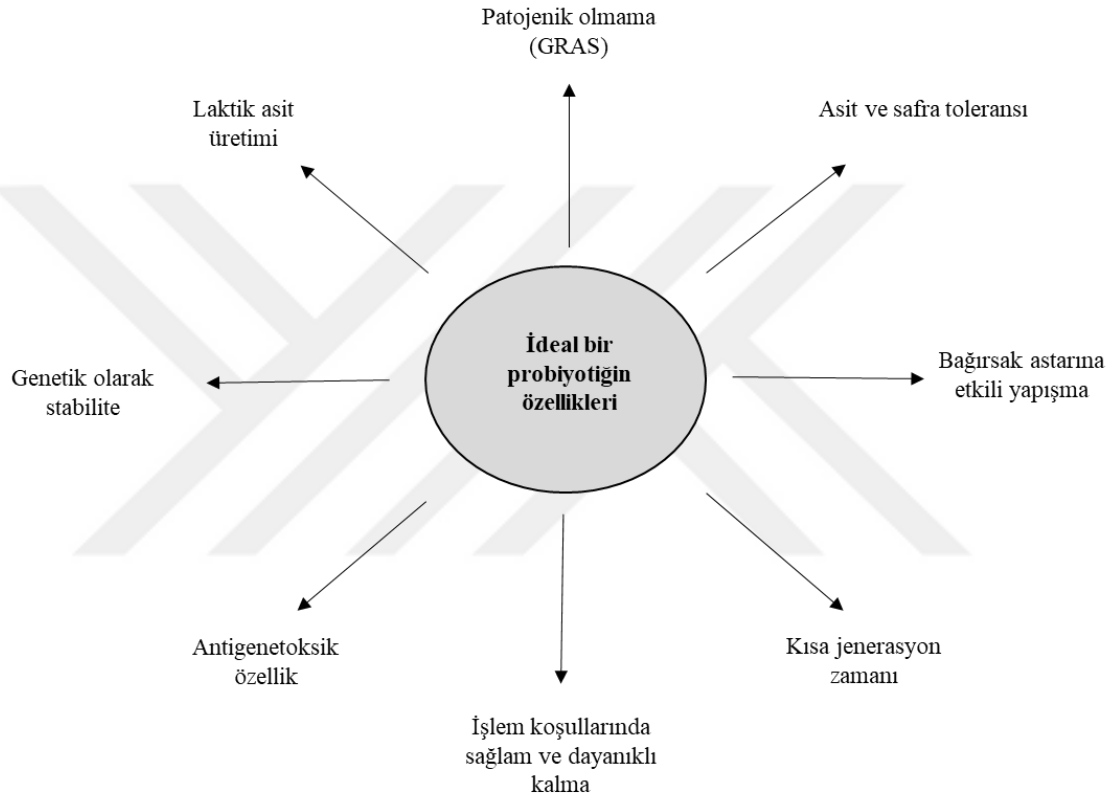
LAB'lerin doğal fermantasyonlarda diğer bakterilere karşı rekabet etme gücü kazandırmaktadır. Yani organik asit (laktik asit gibi) üretiminden kaynaklanan yüksek asitliğe dayanabilmektedirler. Biyosentez yetenekleri çok düşük olmasından dolayı heterotrofik olup genellikle kompleks besiyerlerine ihtiyaç duyarlar. Birçok tür gelişebilmeleri için amino asitlere, nüklotit bazlara, vitaminlere, peptitlere ve yağ asitlerine ihtiyaç duymaktadır. Dolayısıyla LAB'leri bu gereksinimlerinin karşılandığı ortamlarda gelişirler (Carr *et al.* 2002; Khalid 2011).

LAB genel olarak süt ürünlerinde (yoğurt, peynir), ekşi mayalı ekmekte, fermente etlerde (salam), fermente sebzelerde (zeytin, lahana turşusu) ve fermente tahıllarda bulunmaktadır (Mathur *et al.* 2020). LAB fermentasyon sırasında, gıdalarda lezzet gelişimini ve besin değerini artıran, bozulmayı önleyen ve bu nedenle birçok uygulamada, özellikle gıda ve süt endüstrisinde çok faydalı olan organik asitler ve çeşitli metabolitler üretmektedir (Ayivi *et al.* 2020). *Lactobacillus ve Bifidobacterium*, gıda endüstrisinde en çok araştırılan ve yaygın olarak kullanılan cinslerdir.

Laktik asit bakterilerinin bağırsak lümenine çeşitli enzimler ve vitaminler salgıladığı bilinmektedir. Probiyotikler tarafından salgılanan değişik enzimler vasıtasıyla protein, yağ ve karbonhidratların bir ön fermantasyona uğratılması bunların besleyici değerini ve sindirilmelerini kolaylaştırmaktadır. Ca, Mg ve Fe gibi minerallerin daha iyi absorbe edilmesini sağlamaktadırlar. Folik asit, biotin, niasin, pantotenik asit, B1, B2, B3, B6, B9 ve B12 vitaminleri ile K vitaminini sentezledikleri belirlenmiştir (Gu *et al.* 2015; Gu and Li 2016; Markowiak and Slisewska 2017).

İntestinal floranın probiyotik tüketimiyle desteklemesinin sağlık üzerindeki olumlu etkileri uzun yıllardır bilinmektedir. Daha sağlıklı bir yaşam sürmek, vücut direncini artırmak, intestinal düzensizliklerle ve hastalıklarla mücadele etmek için probiyotik tüketiminin gerekli olduğu klinik deneylerle ispatlanmıştır (Laurens-Hattingh and Viljoen 2001, Sullivan and Nord 2005). Probiyotiklerin sağlığı geliştiren etkileri genellikle gastrointestinal sistemden geçiş sırasında hayatta kalmalarına bağlıdır. Sağlık yararlarını göstermek için, probiyotik mikroorganizmaların sindirim koşullarına dirençli olması ve konakçıda yeterli miktarlarda kolonize olması gerekir (Rasika *et al.* 2021). Yaygın antibiyotiklere duyarlı, gastro intestinal toleranslı, katalaz negatif, bağırsağın epitelyal membranına bağlanma kapasitesi olan ve doğal mikroorganizmalarla rekabet edebilen bir mikroorganizmanın kaynağını doğrulamak çok zordur. Bağırsak mikrobiyotası, toksik ve patojenik olmayan, potansiyel olarak tehlikeli mikroorganizmaların büyümesini ve kolonizasyonunu doğrudan veya dolaylı olarak engelleyebilen, besinlerin sindirilebilirliğini iyileştiren ve metabolik bozuklukları azaltabilen,

güvenli, asit ve safra toleranslı olmalıdırlar (Sai Priya and Sarathchandra 2022). Ayrıca probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmalar konakçı sağlığına zarar vermemeli. Bu nedenle probiyotik üretiminde kullanılacak mikroorganizmaların kesin tanısının yapılmış olması gerekmektedir (Salminen and vonWright 1998). Kullanılan suşların mide asitliğine ve safra tuzlarına karşı dirençli olmaları probiyotik mikroorganizma seçiminin en temel kriterlerinden birisidir. Bunun yanında patojenlerle mücadele bakımından bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri antimikrobiyal bileşiklerin üretimi de çok önemli bir kriterdir (Şekil 1) (Goldin and Gorbach 2008).



Şekil 1. İdeal probiyotik özellikleri (Pandey *et al.* 2015)

Probiyotiklerin sağlığa olumlu etkileri; gastrointestinal sistemdeki mikrobiyal dengenin düzenlenmesi, besinlerin biyoyararlanımının arttırılması, laktoz intoleransı semptomlarının hafifletilmesi, serum kolesterol seviyelerinin azaltılması, kolon kanseri riskinin azaltılması, bağırsak astarının bariyer işlevini geliştirerek zararlı maddelerin ve patojenlerin kan dolaşımına girmesinin önlenmesi, kalsiyum emiliminin iyileştirilmesi, duyarlı bireylerin bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi, kısa zincirli yağ asitlerinin ve bazı vitaminlerin sentezlenmesidir (Yoon *et al.* 2006; Argyri *et al.* 2013; Ouwehand *et al.* 2016; Dahiya and Nigam 2020). Çalışmalar, bağırsakta yaşayan mikropların, vagus siniri boyunca hücre tepkilerini etkileyen ve bu sinir yoluyla beyne iletişim gönderen kimyasal haberciler olduğu ileri sürülmüştür (Palukuri *et al.* 2018) .

Küresel probiyotik gıda pazarı, tüketicinin gıdanın sağlık üzerindeki etkisi konusunda artan farkındalığı nedeniyle çok hızlı büyümektedir. Bugün probiyotik ürünler, toplam fonksiyonel gıda pazarını %60 ila %70'ini oluşturmaktadır (Saarela *et al.* 2011). Avrupa ülkelerinde probiyotik süt ürünlerinin en çok tüketilen ürünler arasında ikinci sırada yer aldığı bildirilmektedir (Menrad 2003) . Probiyotik pazarının büyümesindeki ana faktörler arasında artan sağlık bilinci, yüksek stresli yaşam tarzları, beslenme alışkanlıklarındaki değişiklikler, daha sağlıklı bir yaşam tarzı arayışı yer almaktadır. Ayrıca, probiyotiklerin geleneksel ilaçlara alternatif olarak kullanılabilmesi de pazarın büyümesine katkı sağlamaktadır (Yılmaz and Erdem 2020). Küresel probiyotik pazarı büyüklüğünün 2021'de 58,17 milyar dolar olduğu ve bu değerin 2023 yılıyla birlikte 69,3 milyar dolara yükselmesi beklenmektedir (Anonim 2023).

Probiyotikler olumlu etkilerinden dolayı dünyada birçok farklı üründe kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve ticari olarak araştırılmıştır. Tür ve cins seviyelerinde varyasyonlar mevcuttur; bu nedenle esasen aynı cinsin/türlerin diğer üyeleri için farklılıklar göstermektedir. Her bir probiyotik adayının, varsayılan sağlık yararları için deneysel olarak araştırılması gerekir (Kumar Bajaj *et al.* 2014).

E. faecium suşları, probiyotik potansiyelleri açısından incelenmiş ve bu bakterinin insan sağlığı üzerinde yararlı etkileri olabileceği bazı çalışmalarda bildirilmiştir. Örneğin, Türk pastırmasından izole edilen *E. faecium* suşlarının in vitro çalışması yapılmış ve probiyotik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir (Dinçer and Kıvanç 2021).

Lactococcus lactis, laktik asit fermantasyonu ile karbonhidratları laktik aside dönüştüren fakültatif bir anaerobdur. Laktik asit fermantasyonu, düşük pH'da L-laktik asit ve D-laktik asit üretebilir. Süt ürünleri üretiminde yaygın olarak kullanılan bir laktik asit bakterisidir. Aynı zamanda probiyotik özelliği ile de bilinir (Poolman *et al.* 1995). Ayrıca bağırsakta sağlıklı bir mikroorganizma dengesinin korunmasına yardımcı olabildikleri için probiyotik özelliklere sahip oldukları da gösterilmiştir. Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından GRAS statüde olduğu kabul edilmektedir. Lezzet vermenin yanı sıra *L. lactis*, gıdayı koruyan asit de üretmektedir (García-Fruitós 2012)

Lactobacillus casei, Lactobacillaceae familyasındaki en büyük cinse ait bir laktik asit bakterisidir (LAB). İnsan vücudunun üreme ve sindirim sisteminde bulunabilen, spor yapmayan, çubuk şeklinde, gram pozitif bir mikroorganizmadır. *L. casei*, esas olarak süt ve süt ürünlerinden ve ayrıca silaj, ekşi hamur, inek gübresi, insan bağırsak yolu, ağız ve vajinadan izole edilen tipik bir peynir bakterisidir. Gıda endüstrisi, biyoteknoloji ve ilaç sanayisinde probiyotik, starter kültür ve aşı suşu olarak da çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (Salvetti *et al.* 2012).

Bu çalışmada; *Entercoccus faecium* (köy tipi beyaz peynir), *Lactobacillus lactis* (yoğurt) ve *Lactobacillus casei*'nin (köy sütü) probiyotik özelliklerinin ortaya konulması amacıyla; asit ve yüksek safra tuzu konsantrasyonlarına dirençliliği, safra tuzu hidrolizi, antimikrobiyal aktiviteleri, bazı patojen mikroorganizmalara karşı antagonostik etkileri, bakteriosin veya bakteriosin benzeri maddelerin inhibitör etkileri, pepsin- pankreatine karşı gelişimleri, lizozim toleransları, fenol dirençleri, otoagregasyon ve koagregasyon özellikleri belirlenmiştir. Ayrıca probiyotikler için aranan özelliklerden biri olan fitaz üretme kabiliyetleri de ortaya konulmuştur.

KURAMSAL TEMELLER

Wang *et al.* (2010), tarafından anne sütüyle beslenen bebeklerin dışkılarından ve Tayvan lahana turşusundan izole edilen beş izolatın (*Lactobacillus reuteri* F03, *Lactobacillus paracasei* F08, *Lactobacillus rhamnosus* F14, *Lactobacillus plantarum* C06 ve *Lactobacillus acidophilus* C11) probiyotik özellikleri belirlenmiştir. *L. paracasei* F08 ve *L. acidophilus* C11 suşlarının en yüksek β-galaktosidaz aktivitesine sahip olduğu belirtilmiştir. Suşların çoğunun ampisilin, eritromisin ve penisiline duyarlı, aminoglikozitlere ve vankomisine karşı ise dirençli olduğu belirtilmiştir. Beş suşun tamamının, hem gram pozitif (*Bacillus cereus, Listeria monocytogenes ve Staphylococcus aureus*) hem de negatif (*Escherichia coli ve Salmonella enterica*) patojenlere karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca, *L. reuteri F03, L. paracasei F08 ve L. plantarum C06* suşlarının, besin takviyesi olmadan sütte hızla büyüyebildiği ve 37 ºC'de 24 saat fermantasyondan sonra 10^8 cfu/mL'ye ulaşabildiği belirtilmiştir. Sonuç olarak, test edilen izolatların gelecekte yeni fermente gıdalar üretmek için probiyotik starter kültürler olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.

Sarıbuğa (2013), yaptığı çalışmada *Lactobacillus* sp. suşlarından fitaz enziminin izolasyonunu ve karakterizasyonunu gerçekleştirmiştir. Suşların fitaz üretimi kolonilerin etrafında oluşan zon çapı ile belirlenmiştir. En iyi aktivite gösteren *L. plantarum* ve *L. acidophilus*'dan üretilen enzimlerin maksimum aktiviteleri pH 6,0'da 167,3 EU/mL ve pH 5,0'de 163,1 EU/mL olarak belirlenmiştir. *L. plantarum* ve *L. acidophilus* enzimlerinin karakteristik özelliklerden dolayı endüstriyel alanda kullanıma uygun olduğu belirlenmiştir.

Khodaii *et al.* (2013), ticari probiyotik preparatlardan, süt ürünlerinden ve tip suşlardan izolatlar da dahil olmak üzere 43 laktik asit bakterisinin fitaz aktivitesi ölçülmüştür. Probiyotik bakterilerin enzim aktivitesinin 1,1-5,4 mU arasında değiştiği rapor edilmiştir. Fitaz aktivitesinin, gıda katkı maddesi olarak kullanılmak üzere probiyotiklerin yararlı bir ek özelliği olabileceği belirtilmiştir.

Patki *et al.* (2015), fitaz üreten bakterileri mangrov toprağından izole etmiş ve ardından bu bakterilerden enzimi kısmi olarak saflaştırmış ve hidroliz verimini hesaplamışlardır. Hidroliz verimi daha yüksek olan 5 izolat fitaz üretimi için incelenmiştir. Fitaz enzimi, çalkalanmış şişe fermantasyonu kullanılarak üretilmiş ve amonyum sülfat çökeltmesi ve diyaliz kullanılarak kısmen saflaştırılmıştır. Enzimin 45-55 °C'lik optimum bir sıcaklık aralığı göstermiş ve 60

°C'de %51 aktiviteyi korumuştur. Optimum pH değeri 5 olarak kaydedilmiş ve enzimin, pH 2-5 aralığında stabil olduğu belirtilmiştir.

Yadav *et al.* (2016), Hindistan'ın Haryana ve Rajasthan bölgelerinde tüketilen yerli fermente içecek Raabadi'den izole ettikleri *L. plantarum*'un probiyotik özelliklerini belirlemeyi amaçlamışlardır. Toplam beş Raabadi örneği aseptik olarak toplanmış ve 54 izolat MRS ortamında saflaştırılmıştır. Bu izolatlar hücre yüzeyi hidrofobikliği, hipokolesteramik aktivite, anti-oksidatif potansiyel, antagonistik aktivite ve antibiyotik direnç, düşük pH ve safra tuzlarına tolerans açısından in vitro olarak değerlendirilmiştir. 54 izolattan sadece 24'ünün simüle edilmiş mide koşullarında hayatta kalabildiği ve *L. plantarum* RYPR1 ve RYPC7, pH 2'de hayatta kalma başarısı gösterdiği bildirilmiştir. *L. plantarum* RYPR1'nin %79,13' lük bir değerle en yüksek hidrofobikliği gösterdiği, epitel hücrelerine yapışma ve kolonizasyona yardımcı olan safra tuzlarının dekonjugasyonunda etkili olduğu belirtilmiştir. *L. plantarum* RYPR1'in mükemmel bir probiyotik potansiyeline sahip olduğunu yapılan testler sonucu ortaya çıkarmışlardır.

Demir *et al.* (2018), Lor peynirinden izole ettikleri *L. coryniformis* suşundan fitaz enzimini saflaştırmış ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Enzim, % 2,60 geri kazanım ve 202,25'lik spesifik bir aktivite (EU / mg protein) ile elde edilmiştir. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yöntemi ile enzimin moleküler kütlesi 43,25 kDa olarak belirlenmiştir. Enzim için optimum sıcaklık ve pH sırasıyla 60 °C ve 5,0 olarak bulunmuştur.

Bhagat *et al.* (2019), yaptıkları çalışmada Kalarei'den izole ettikleri LAB'nin fitaz üretme potansiyellerini belirlemişlerdir. Maksimum fitaz aktivitesi gösteren suş, probiyotik özellikleri açısından incelenmiştir. Maksimum enzim aktivitesi gösteren iki izolat KJ ve K seçilmiştir. Fitaz üretimi için optimizasyon çalışmalarında, izolat K maksimum (5,92 U/mL) enzim aktivitesi göstermiş ve ribotipleme yoluyla *L. paracasei* olarak tanımlanmıştır. Enzimin moleküler ağırlığı 70 kDa ve optimum aktivite 37 °C, pH 5,5'te belirlenmiştir. Bu suş *L. paracasei* SMVDUDB1 olarak adlandırılmış ve önemli probiyotik özellikler göstermiştir.

Nami *et al.* (2019), yaptıkları çalışmada farklı geleneksel süt ürünlerinden izole ettikleri *Enterococcus* izolatlarının probiyotik karakterizasyonu ve güvenlik değerlendirmesini ortaya koymayı amaçlamışlardır. Tüm izolatların, *Staphylococcus aureus, Shigella flexneri, Klebsiella pneumoniae, Yersinia enterocolitica, Escherichia coli, Listeria monocytogenes* ve *Bacillus subtilis* dahil olmak üzere çeşitli gıdalarda bozulmaya neden olan bakterilere ve gıda kaynaklı patojenlere karşı inhibitör aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca izolatların vankomisin, gentamisin ve kloramfenikol'e karşı duyarlı olduklarını saptamışlardır. Seçilen

izolatlar, düşük pH'a ve safra tuzlarına karşı yüksek tolerans, hidrofobik aktivite, otoagregasyon ve insan bağırsak Caco-2 hücre hattına yapışma kabiliyeti göstermişlerdir. Çalışma sonucunda *Enterococcus* izolatlarının, özellikle *E. durans* ES11, ES20 ve ES32'nin, sağlık yararlarını teşvik etmek için fonksiyonel gıdaların üretiminde mükemmel adaylar olabileceğini ortaya koymuşlardır.

Somashekaraiah *et al.* (2019), Neera örneklerinden toplam 75 izolat izole etmiş ve bu izolatların kültürel, mikroskobik ve biyokimyasal özelliklerini taramışlardır. İlk taramada, fenole dirençli asit-safra toleranslı, Gram pozitif ve katalaz negatif 40 izolat belirlenmiştir. 40 izolattan 16'sı, hücre yüzeyi hidrofobisitesi, epitel hücrelerine yapışma ile otomatik agregasyon ve gastrointestinal kolonizasyon için mide-pankreatik sindirim analizinde olumlu sonuçlar göstermiştir. İzolatlar ayrıca antimikrobiyal, antibiyotik duyarlılığı ve anti-oksidatif potansiyel açısından da değerlendirilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, en iyi probiyotik özelliklere sahip yedi izolat seçilmiş ve bu izolatların düşük pH'da %51,91–70,34 oranında sağkalım, %50,32-77,8'lik hücre yüzeyi hidrofobikliği ve %51,02-78,95'lik otomatik agregasyon gösterdiği belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlar, Neera'dan izole edilen LAB'nin umut verici probiyotik özellikler sergilediğini ve fonksiyonel kullanım için uygun olduğunu kanıtlamıştır.

Singhal *et al.* (2019), Hindistan'ın farklı bölgelerinden toplanan rizosferik toprak örneklerinden *E. faecium*'un izolasyonunu ve karakterizasyonunu yapmıştırlar. Çalışmlarının sonucunda rizosferik izolatların, gastrointestinal kanalının zorlu koşullarında iyi bir hayatta kalma gösterdiğini ve hiçbir virülans genini barındırmadığını belirtmişlerdir. Tüm izolatların kolesterol giderme potansiyeli gösterdiğini ve *E. faecium* izolatı LR13'ün, dikkate değer kolesterol giderme kapasitesi ve vankomisine duyarlılık sergilediğini ve umut verici bir probiyotik adayı olduğunu belirtmiştir.

Souza *et al.* (2019), *L. casei* ve *L. fermentum* suşlarının ko-agregasyon, oto-agregasyon, β-galaktosidaz üretimi, gastrointestinal kanalda (GIT) hayatta kalma, hidrofobiklik ve antibiyotik duyarlılığı değerlendirmişlerdir. Çoğu suşun yüksek düzeyde otomatik kümelenme ve düşük hidrofobiklik gösterdiği ve bazı suşların diğer LAB veya patojenlerle agregasyon yeteneği sergilediğini belirtmişlerdir. Altı *L. fermentum* ve yedi *L. casei* suşunun, β-galaktosidaz ürettiği, in vitro olarak değerlendirilen on suşun, gastrointestinal kanalın benzer zorlu koşullarında hayatta kaldığı ve tüm suşların vankomisine ve kanamisine dirençli olduğu rapor etmişlerdir. *L. casei* SJRP38 ve *L. fermentum* SJRP43'un diğer suşlara göre daha yüksek probiyotik potansiyelleri sergilediğini belirtmişlerdir.

Kondrotiene *et al.* (2020), çiğ sütte bulunan 169 *L. lactis* suşu arasından seçilen 33 *L. lactis* suşunu probiyotik özellikleri açısından değerlendirmişlerdir. Suşlar hücre yüzeyi

hidrofobikliği, safra asitlerinde ve kolesterolde büyüme, antibiyotik duyarlılık, hemolitik, jelatinaz aktivite ve enzimatik aktivite, safra tuzlarına ve aside direnç açısından değerlendirilmiş ve probiyotik potansiyeli yüksek olan iki suş seçilmiştir. Çeşitli safra tuzu konsantrasyonlarına karşı %80'den fazla direnç gösteren ve düşük pH'ta %51 ve %67 oranında hayatta kalan *L. lactis* suşunun in vitro mide koşullarına karşı dirençli olduğu rapor edilmiştir. Suşların asitleştirici ve başlangıç kültürleri olarak fonksiyonel süt gıdalarının geliştirilmesinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Koçak ve Çiftci (2020), tavukların bağırsak mukozasından 9'u *L. acidophilus* olmak üzere 21 adet *Lactobacillus* spp. ve 20 adet *E. faecium* suşu izole etmiş ve izolatların % 0,5-1,0 safra konsantrasyona ve pH 3-5'e dirençli olduklarını saptamışlardır. İzolatların tamamının hidrofobik karakterde olduğunu, ancak hiçbir suşun *E. coli*'ye karşı antagonistik etki göstermediğini belirlemişlerdir. Yapılan çalışmada *E. faecium* izolatının 8 tanesinin 8 (ampisilin, neomisine, eritromisin, amoksisilin/klavulanik asit, oksitetrasiklin, linkomisine, enrofloksasin, trimetoprim/sulfametaksazol, amoksisiline) antibiyotiğe, *L. acidophilus* izolatlarından da 1 tanesinin 7 (ampisilin, enrofloksasin, oksitetrasiklin, eritromisin, linkomisin, neomisin, trimetoprim/sulfametaksazol) antibiyotiğe ve *Lactobacillus* spp. izolatlarından 1 tanesinin 5 (vankomisin, tetrasiklin, ampisilin, gentamisin ve siprofloksasine) antibiyotiğe dirençli olduğunu belirlemişlerdir. Elde edilen sonuçlar neticesinde *L. acidophilus, E. faecium* ve *Lactobacillus* spp. izolatlarından antibiyotik direnci gösterenlerin probiyotik özellikte kullanılabilir olduğunu belirtmişlerdir.

Yerlikaya and Akbulut (2020), çiğ süt ve çeşitli süt ürünlerinden izole ettikleri ve tanımladıkları *E. durans* ve *E. faecium* suşlarının antimikrobiyal aktivitelerini, vankomisin dirençlerini, pH ve safra tuzlarına dirençlerini, safra tuzu dekonjugasyonlarını ve hidrofobiklikleri gibi bazı probiyotik özelliklerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda *Enterococcus* suşlarının antimikrobiyal aktivite profillerinin, pH ve safra tuzu dirençlerinin ve safra tuzu dekonjugasyon yeteneklerinin tür ve suşlara göre değişiklik gösterdiğini ve tüm suşların test edilen safra tuzu konsantrasyonlarına direnç gösterdiğini belirlemişlerdir. Test ettikleri *E. faecium* ve *E. durans* suşlarının probiyotik özellikler gösterdiğini ve gıda üretiminde kullanılma potansiyeline sahip olduklarını belirtmişlerdir.

Hassan *et al.* (2020), yaptıkları çalışmada, geleneksel Pakistan yoğurdundan izole ettikleri *L. helveticus* ve *L. plantarum'un* bakteriyosin üreten izolatlarının probiyotik özelliklerini değerlendirmişlerdir. İzolatların asidik pH (6-6,5), safra tuzu (%0,01-1) ve %1-7 NaCl ye karşı direnç ve on farklı gıda kaynaklı patojene karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği belirlenmiştir. İzolatların *Actinobacter baumannii*'ye karşı etkili olduğu ancak *Klebsiella*

pneumoniae ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı az etki gösterdiği rapor edilmiştir. Birkaç izolatın vankomisin, gentamisin, eritromisin, streptomisin ve klindamisin gibi bazı antibiyotiklere dirençli olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmada kullanılan diğer izolatlara göre *L. helveticus* izolatlarından LBh5'in iyi bir probiyotik izolat olarak kabul edildiğini belirtmişlerdir.

Nath *et al.* (2020), fermente çiğ sütten izole edilen *L. plantarum*, biyokimyasal testlerle tanılamış ve 16S rRNA tanımlaması ile doğrulamışlardır. *L. plantarum* GCC_19M1 suşu'nun düşük pH, %0,3 safra, %0,5 pankreatin ve %5 NaCl'ye karşı önemli tolerans gösterdiği saptanmıştır. *L. plantarum* GCC_19M1 suşunun gentamisin, tetrasiklin, kanamisin, meropenem ve seftriakson'a karşı duyarlılık gösterdiği ve patojenik bakteriler üzerinde antagonistik bir etki sergilediği belirtilmiştir. *L. plantarum* suşunun güçlü probiyotik potansiyeline sahip olduğu ve fermente çiğ süt ürünlerindeki varlığının güçlü bir fonksiyonel probiyotik gıda olarak hizmet edebileceği sonucuna varılmıştır.

Penidez *et al.* (2020), psödokerlerden izole ettikleri fitaz aktivitesine sahip LAB'ni seçmiş, üretimlerini ve aktivitelerini karakterize etmiş ve enzimi saflaştırmışlardır. *L. plantarum* CRL1964 (PhyLP)'un fitazı, değerlendirilen 73 LAB'den en yüksek spesifik aktiviteyi gösteren bakteri olduğu belirtilmiştir. PhyLP' nin termostabil olduğu ve asidik koşullar altında aktivitesini sürdürdüğü belirtilmiştir. PhyLP kısmen saflaştırılmış ve 55 kDa'lık bir moleküler kütle göstermiştir. *L. plantarum* CRL1964 ve / veya PhyLP' un, hayvan yemlerinde ve gıda endüstrisinde tahıl ürünlerinin işlenmesine dâhil olma potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir.

Al-Harthi *et al.* (2020), yaptıkları çalışmada erken büyüme aşamasında etlik piliçler için 500 FTU/kg bakteriyel *E. coli* fitaz (BECP) diyeti içeren veya içermeyen peletlenmiş diyetlerde zeytin kekinin (OC) etkisini değerlendirmek için bir besleme denemesi yapmışlardır. Erken büyüme evresindeki etlik piliçler, büyüme performansı, karkas özellikleri, plazma lipid profilleri üzerinde olumsuz etkiler olmaksızın, BECP ilaveli veya ilaveli %15'e kadar OC içeren peletlenmiş diyetle beslenebilirken, %10 OC diyetlerine fitaz takviyesi, maliyet ve ekonomik verimlilik üzerinden en yüksek getiriyi sağladığını belirtmişlerdir.

Pradhan and Tamang (2021), Doğu Himalayaların kuru başlatıcılarından izole ettikleri 37 LAB suşunun probiyotik ve bazı fonksiyonel özelliklerini taramışlardır. LAB suşlarının yaklaşık %38'inin, %0,3 safra tuzlarında ve pH 3'te yüksek hayatta kalma oranı (> %50), *Enterococcus durans* BPB21 ve SMB7, %98 ile en yüksek hidrofobiklik yüzdesi gösterdiğini belirtmişlerdir. LAB suşlarının yaklaşık %65'inin β galaktosidaz üretebildiği, suşların çoğunun fitaz aktivitesi gösterdiği ancak suşların hiçbirinin amilaz aktivitesi göstermediği belirtmiştir.

Bazı probiyotik ve fonksiyonel işaretleyici genlerin genetik taramasını analiz etmişlerdir. clp L, agu A, apf, mubl ve map A geninin oluşumunun diğer genlere göre daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. *Pediococcus pentosaceus* SMB13-1 ve *Enterococcus faecium* BPB11'de bsh geni (safra tuzu toleransı) tespit etmişlerdir. Probiyotik ve fonksiyonel özelliklere sahip olan LAB'nin, gelecekte gıda endüstrisi için araştırılabilir olduğunu belirtmişlerdir.

Sornsenee *et al.* (2021), Tayland'da palmiye özünden izole ettikleri LAB'nin in vitro ortamda antimikrobiyal ve probiyotik özelliklerini değerlendirmeyi amaçladıkları bu çalışmada, izole ettikleri 40 LAB türü arasından 10'u antimikrobiyal aktiviteleri nedeniyle seçilmiştir. Bu 10 izolat, MALDİTOF MS ve 16S rRNA dizilimi ile *L. paracasei* (8/10), *L. fermentum* (1/10) ve *L. brevis* (1/10) olarak tanılanmıştır. İzolatlar patojenlere karşı probiyotik özellikler ve antimikrobiyal aktivite açısından değerlendirilmiştir. Bu izolatların, düşük pH, pepsin, pankreatin ve safra tuzları dahil olmak üzere simüle edilmiş gastrointestinal sistem koşullarına karşı toleranslı olduğu belirtilmiştir. 10 izolatın, güçlü otoagregasyon ve hücre yüzeyi hidrofobikliğini koruduğu belirtilmiştir. İzolatların eritromisin, ampisilin, klindamisin, kloramfenikol ve tetrasiklin'e duyarlı, kanamisin, vankomisinve streptomisine dirençli olduğu saptanmıştır. Tüm izolatların, dokuz patojenik bakteriye karşı iyi antibakteriyel aktivite sergilediği belirtilmiştir. Bu 10 *Lactobacillus* izolatının, fonksiyonel fermente gıdalar ve farmasötik ürünlerde probiyotikler olarak kullanım için uygun olduğu belirtilmiştir.

Riane *et al.* (2021), yaptıkları çalışmada sütten izole ettikleri *L. plantarum* 15'in probiyotik özelliklerini (antibakteriyel aktivite, asidik pH ve safra tuzuna direnç) ve antioksidan aktivitesini araştırmışlardır. *L. plantarum* 15'in asitliğe (%86,40) ve safra tuzlarına (%80,58) karşı dirençli olduğunu ve birkaç bakteri suşuna karşı inhibe edici bir aktivite sergilediğini belirtmişlerdir. DPPH yöntemiyle değerlendirilen antioksidan potansiyeli, *L. plantarum* 15 hücrelerinin (%82,65) ve hücresiz süpernatanın (%72,21) önemli bir temizleyici etkiye sahip olduğunu rapor etmişlerdir. *L. plantarum* 15'in güçlü bir antioksidan probiyotik gıda takviyesi olarak kabul edilebilir olduğunu öne sürmüşlerdir.

Divyashree *et al.* (2021), çalışmalarında taradıkları 130 izolattan 12'sini probiyotik özellikler açısından karakterize etmişler ve en iyi probiyotik özellik gösteren iki izolatı değerlendirmişlerdir. *L. casei* – MYSRD 108 ve *L. plantarum*-MYSRD 71 izolatlarının gastrik koşullarda hayatta kaldığını ve test edilen antibiyotiklere duyarlı olduğunu belirtmişlerdir. İzolatların, %89,2 ve %88,5'lik otoagregasyon ve %61 ve %64'lük hücre yüzeyi hidrofobikliği gösterdiği belirlenmiştir. 16sRNA dizileme sonucunda izolatların *L. casei* (MYSRD 108) ve *L. plantarum* (MYSRD 71) olduğu doğrulanmıştır. Her iki izolatın farklı bakteriyel patojenleri

inhibe ettiği belirtilmiştir. Bu suşların, gıda endüstrisinde antimikrobiyal bileşikleri üretmek için kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

Soundharrajan *et al.* (2021), yaptıkları çalışmada LAB'ni izole etmişler ve probiyotik özellikleri, bağırsak patojenlerine karşı antagonistik aktiviteleri, minimum inhibitör ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MIC/MBC), zaman ve doza bağlı öldürme deneyi ve ko-kültür yöntemleri bakımından değerlendirmişlerdir. *L. lactis* RWP-3 ve RWP-7'nin, karbonhidrat substratlarını fermente ettiği ve farklı hücre dışı enzimleri ürettiğini ve gastrik, duodenal ve bağırsak sularına karşı tolerans kapasitesinin yüksek olduğunu belirlemişlerdir. RWP-3 ve RWP-7'nin, hidrofobiklik ve agregasyon özelliklerine sahip olduğu ve *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterococcus faecalis*'e karşı güçlü antibakteriyel aktivite gösterdiği rapor edilmiştir.

Baloch *et al.* (2021), fitaz enziminin etlik piliçlerin büyüme performansı ve kan profili üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir. Kuşlar dört gruba ayrılmış ve piliç yemlerine farklı oranlarda fitaz enzimi ilave edilmiştir (Grup A (kontrol) 0 g/kg, 0,05 g/kg (grup B), 0,075 g/kg (grup C) ve 0,025 g/kg (grup D)). Çalışma sonucunda, 0,075 g/kg fitaz enzimi ilavesinin etlik piliçlerin büyüme performansı ve kan profili üzerinde daha iyi bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

Ali (2021), yaptığı çalışmada bir günlük 108 erkek etlik piliçlerin diyetlerine fitaz ilaveli di-kalsiyum fosfat (DCP) eklenmiş veya eklenmemiş yemlerin etlik piliçlerin diyetleri üzerindeki etkisi araştırmıştır. Uygulama Deneme T1 (kontrol + %0,1 DCP ile desteklenmiş bazal diyet), deneme T2 (1500 FTU/Kg fitaz + %0,1 DCP ile desteklenmiş bazal diyet) ve deneme T3 (1500 FTU/Kg fitaz ile takviye edilmiş bazal diyet) şeklinde tasarlanmıştır. Sonuçlar, yem tüketimi, canlı ağırlık, canlı ağırlık artışı ve yem dönüşüm oranında önemli ($P \leq 0,05$) farklılıklar göstermiş ve en iyi uygulamanın T3 olduğu rapor edilmiştir.

Tilwani *et al.* (2022), yaptıkları çalışmada *Cyprinus carpio specularis*'in bağırsağından izole ettikleri bir probiyotik bakteri olan *Enterococcus faecium* MC-5'in probiyotik özelliklerini belirlemişlerdir. *E. faecium* MC-5 suşunun, düşük pH, yüksek safra tuzu, lizozim ve fenole karşı yüksek direnç, iyi bir otoagregasyon ve ko-agregasyon özelliği gösterdiği ve patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite sergilediği belirtilmiştir. MC-5 suşu, yüksek safra tuzu hidrolaz aktivitesi ve %70,27'lik önemli bir kolesterol giderme yeteneği gösterdiği rapor edilmiştir. MC-5 suşunun probiyotik özelliklere sahip olduğu ve bu nedenle gıda ve ilaç endüstrilerinde biyo-koruyucu kültürler ve/veya biyo-kalkan olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir.

Hadef *et al.* (2022), geleneksel keçi yağı ve üç çeşit peynirden yirmi beş LAB suşunu (8 *Lactobacillus*, 4 *Lactococcus*, 11 *Enterococcus* ve 2 *Leuconostoc*) izole etmişler ve teknolojik yetenekleri, probiyotik özellikleri açısından değerlendirmişlerdir. Probiyotik potansiyel ve fenotipik karakterizasyonlar yapıldıktan sonra *Lactobacillus* ve *Enterococcus* cinsine ait asit toleransı iyi olan BM10, B15 ve C30 üç suş belirlemişlerdir. Bu suşların, %0,5 safra tuzlarına ve %0,4 fenole karşı önemli bir direnç gösterdiği, ayrıca iyi bir hidrofobiklik ve otoagregasyon özellik sergilediği belirtilmiştir. Seçilen tüm suşların *Listeria innocua*'ya karşı önemli bir antimikrobiyal aktivite sergilediği belirlenmiştir. 16S rRNA genotipik tanımlama sonucunda B15, BM10 ve C30'un sırasıyla *L. plantarum*, *L. casei* ve *E. durans* olduğu doğrulamış ve bu suşların gıda endüstrisinde probiyotik başlatıcı kültürler olarak yüksek potansiyele sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Çalışmada Kullanılan Alet ve Ekipmanlar

- ✓ Steril Kabin (ESCO Class 2 Nuaıre 425-500E)
- ✓ Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı **(**HEIDOLPH MR HEI STANDART)
- ✓ UV- Spektrofotometre (SHIMADZU UV-1800 UV-VIV)
- ✓ Plastik Petri Plakları (ISOLAB)
- ✓ Etüv (MEMMERT)
- ✓ Otoklav (HİCLAVE HV-50 L)
- ✓ Cam Erlen (250 ml) (ISOLAB)
- ✓ Cam Beher (250 ml) (ISOLAB)
- ✓ pH Metre (METTLER TOLEDO)
- ✓ Parafilm (ISOLAB)
- ✓ Hassas Terazi (SHIMADZU)
- ✓ Santrifüj Cihazı (BECKMAN COULTER)
- ✓ Otomatik Pipet (1 ml) (EPPENDORF)
- ✓ Otomatik Pipet (0.5-5 ml) (EPPENDORF)
- ✓ Buzdolabı (ARÇELİK)

Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- ✓ MRS Broth (Oxoid)
- ✓ MRS Agar (Oxoid)
- ✓ M17 Broth (Oxoid)
- ✓ M17 Agar (Oxoid)
- ✓ Hidroklorik Asit (HCl) (ISOLAB)
- ✓ Sodyum Hidroksit (NaOH) (SIGMA-ALDRICH)
- ✓ Sodyum Fitat
- ✓ Sodyum Asetat ($C_2H_3NaO_2$) (ISOLAB)
- ✓ Trichloroacetic acid
- ✓ Demir Sülfat ($FeSO_4$) (SIGMA-ALDRICH)
- ✓ Phosphate Buffered Saline (SEROX)
- ✓ D (+) Glucose Monohydrate (ISOLAB)

- ✓ Kalsiyum Klorür ($CaCl_2$) (CARLO ERBA)
- ✓ Bile Bovine, Powder (ACROS ORGANİCS)
- ✓ Lizozim (NACALAİ TESQUE)
- ✓ Gliserol (ISOLAB)
- ✓ Fenol (ISOLAB)
- ✓ Pepsin (MERCK)
- ✓ Pankreatin (ACROS ORGANİCS)
- ✓ Fitaz

Metod

Bakterilerin Geliştirilmesi

Stok kültürden MRS/M17 agara ekim yapılmış ve bakteriler inkübasyona (her bir bakteri optimum gelişme sıcaklığında) bırakılmıştır. MRS/M17 agar'da gelişen bakteriler MRS/M17 Broth'a inoküle edilmiş ve optimum gelişme sıcaklığında etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen bakterilerin sıvı kültürleri probiyotik özelliklerin belirlenmesi için in vitro çalışmalarda kullanılmıştır.

Suşların Probiyotik Özelliklerinin İn Vitro Koşullarda Belirlenmesi

Asit dirençliliğinin belirlenmesi

16 saatlik bakteri suşları, HCl (hidroklorik asit) kullanılarak pH 2, 2,5 ve 3'e ayarlanan M17/MRS broth'a aktarılmış ve 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra, PBS çözeltisinde (0,01M pH 6,2) seri dilüsyonlar yapılarak, 100 µL alınmış M17/MRS agara yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. 24 saatlik inkübasyondan sonra petrideki canlı mikroorganizma sayısı belirlenmiştir (Hyronimus *et al.* 2000).

Safra tuzuna toleransın belirlenmesi

Bakterilerin safra tuzu dirençliliği, Dunne *et al.* (2001)' a göre yapılmıştır. İçerisine %1,5, %1,0, %0,5 ve %0,3 (w/v) oranında oxgall ilave edilmiş M17/ MRS broth'a, 16 saatlik bakteri izolatları inoküle edilmiş ve 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası fizyolojik su içerisinde her kültürden (10^5 CFU) dilisyon yapılmış ve 100 µL alınarak M17/ MRS agara (pH 6,2) ekim yapılmıştır. Daha sonra suşlar 24 saat inkübasyona bırakılmış ve canlı koloni sayımı yapılmıştır (Liong *et al.* 2005).

Pepsin direncinin belirlenmesi

İzolatların pepsin dirençlerinin belirlenebilmesi için PBS tamponun pH'sı 3,0 ve 2,0'ye ayarlanmış ve 3 mg/mL pepsin ilave edilmiştir. PBS tamponuna kültürlerden % 1 oranında aşılanmış ve 3 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Tokatlı *et al.* 2015). İnkübasyonun başlangıç, 1. ve 3. saatlerinde canlı bakteri sayımları yapılmıştır.

Pankreatin direncinin belirlenmesi

İzolatların pankreatin dirençlerini belirlemek için pH'sı 8,0 olan PBS tamponuna 1 mg/mL pankreatin ilave edilmiştir. PBS tamponuna kültürlerden %1 oranında inokülasyon yapılmış ve 4 saat inkübasyona bırakılmıştır (Maragkoudakis *et al.* 2006). Başlangıç ve 4. saatte canlı bakteri sayımı yapılmıştır.

Lizozim toleransının belirlenmesi

İzolatların lizozim toleranslarını belirlemek amacıyla 100 mg/L lizozim olacak şekilde ve lizozim olmaksızın 10 mL MRS Broth'a aktif haldeki kültürlerden % 1 oranında inoküle edilmiş ve 90 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Turchi *et al.* 2013). Başlangıç ve 90. dakikada canlı bakteri sayımı yapılmıştır.

Fenol toleransının belirlenmesi

% 0,3 fenol içeren ve içermeyen MRS/M17 Broth'lara 18 saat 30˚C'de inkübasyona bırakılmış kültürlerden % 1 oranında inoküle edilmiştir. Başlangıç ve 24. saatin sonunda numunelerden örnekler alınmış ve seri dilüsyon sonrası sayım yapılmıştır (Kılıç *et al.* 2013).

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

Suşlarının rifampin (5 µg), trimetoprim (5 µg), basitrasin (10 unit), penisilin (10 unit), gentamisin (10 µg), ampisilin (10 µg), piperasilin (100 µg),seftazidim (10 µg), meropenem (10 µg), eritromisin (15 µg), tetrasiklin (30 µg), teikoplanin (30 µg) ve vankomisin (30 µg) antibiyotiklerine duyarlılıkları gözlemlenmiştir. Aktif kültürlerden 100 µL alınarak MRS/M17 agara aktarılmış ve yayma ekim yapılmıştır. Bakteri bulunan petriler üzerine antibiyotik diskler steril bir şekilde yerleştirilmiş ve her bir bakteri için optimum sıcaklık değerinde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası disk etrafında oluşan zonların çapı milimetrik olarak ölçülmüştür. Sonuçlar NCCLS'ye göre değerlendirilmiştir (Şimşek *et al.* 2006).

Bazı patojen mikroorganizmalara karşı antagonostik etkilerin belirlenmesi

Aktif kültürler 15 dakika 5000 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant kısım mikrofiltrasyon yolu ile filtreden (0,45 µm) geçirilerek steril edilmiştir. Patojen olarak seçilen

Escherichia coli, Pantoea aeruginosa, Staphylococcus aureus ve *Salmonella enteritidis* Nutrient Broth'ta uygun sıcaklıkta inkübe edilmiş ve Nutrient Agara aktarılmıştır. Daha sonra steril çubukla üzerine 6 mm'lik kuyucuklar açılmış ve başlangıç süpernatantlarından 100 µL aktarılmıştır. 24 saat sonunda kuyucuk çevresindeki zon çapları milimetrik olarak ölçülmüştür (Stewart and Vavrek 1986).

Bakteriosin/ bakteriosin benzeri metabolitlerin inhibitör etkisi

Suşlar % 0,2 glikoz içeren MRS/ M17 broth'a inoküle edilmi ve 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra laktik asidin inhibitör etkisini önlemek amacıyla sıvı kültürlerin pH'sı 1 N NaOH ile 6.5' e ayarlanmış, 5000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant membran filtreden (0,45 µm) süzülerek steril edilmiştir. Patojen bakteriler (*E. coli, P. aeruginosa, S. aureus* ve *S. enteritidis*), Nutrient Broth'a inoküle edilerek aktifleştirilmiş ve daha sonra 50 µL alınarak Muller Hinton Agara aktarılmıştır. Steril çubukla agar üzerine 6 mm kalınlığında kuyucuklar açılmış ve süpernatantlardan 100 µL aktarılmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonrası kuyucuk etrafında oluşan zon bölgesinin çapı ölçülmüştür (Ashraf 2009).

Otoagregasyon özelliklerinin belirlenmesi

Sıvı kültürler her bir bakteri için optimum sıcaklık değerinde 18 saat inkübasyona bırakılmış ve daha sonra 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. PBS ile yıkanmış ve optik yoğunluğu 600 nm de 0,60±0,02 olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan kültür (4 mL) 10 saniye vortekslenerek oda sıcaklığında 5 saat boyunca sabit şekilde bekletilmiştir. Başlangıç, 2. ve 5. saatlerde kültürün üst kısmından 0,1 mL alınarak 3,9 mL PBS ile seyreltilmiştir. Seyreltilen kültürün inkübasyon öncesi ve sonrası optik yoğunluğu 600 nm'de okunmuştur. Otoagregasyon (%) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Collado *et al.* 2008).

Otoagregasyon (%) = [1- (At/A0) x 100]

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

Koagregasyon özelliklerinin belirlenmesi

Sıvı kültürler her bir bakteri için optimum sıcaklık değerinde 18 saat inkübasyona bırakılmış ve daha sonra 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. PBS ile yıkanmış ve optik yoğunluğu 600 nm de 0,60±0,02 olacak şekilde ayarlanmıştır. Koagregasyon için Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü N. Dikbaş kültür koleksiyonundan temin edilen *E. coli* kullanılmıştır. Patojen bakteri kültüründen 1 mL alınarak LAB kültürü ile eşit oranda karıştırılarak homojen bir karışım elde edilmiş ve oda sıcaklığında

4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 600 nm'de karışımın optik yoğunluğu ölçülmüştür. Koagregasyon (%), aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Collado *et al.* 2008).

Koagregasyon (%) = [(OD1+OD2) - 2(OD3)/ (OD1+ OD2)x100]

OD1: Laktik asit bakterisinin optikal dansitesi

OD2: *E. coli*'nin optikal dansitesi

OD3: 4 saat sonunda karışımın optikal dansitesi

Sindirim sistemi modellemesi

Sindirim sistemi modellemesi için pH'sı 3,0 olarak ayarlanmış PBS tamponuna 3 mg/mL pepsin ilave edilmiş ve aktif kültürlerden % 1 oranında inokülasyon yapılmış, 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun başlangıç ve 3. saatinin sonunda canlı bakteri sayımı yapılmıştır (Maragkoudakis *et al.* 2006). İnkübasyon sonrası kültürler 3500 rpm'de santrifüj edilmiş ve çökelti alınmıştır. Çökelti PBS tamponu ile yıkanmış ve daha sonra % 1 oranında 1 mg/mL pankreatin ve % 1 Ox-Bile ilave edilmiş pH'sı 8,0 olan PBS tamponuna inoküle edilmiştir (Tokatlı *et al.* 2015). İnkübasyonun başlangıç ve 4. saatlerinde canlı bakteri sayımları yapılmıştır.

Fitaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi

Fitaz aktivite tayini için gerekli olan substratın hazılanması amacıyla; 0,05 g sodyum fitat tartılmış, 80 mL sodyum asetat tamponu içerisinde çözüldükten sonra son hacmi 100 mL tamamlanmıştır. Aktivite tayini hesaplanırken 100 µL enzim çözeltisi üzerine 250 µL substrat eklendikten sonra vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra 10 dakika 50°C'ye ayarlanmış su banyosunda reaksiyona sokulmuştur. Reaksiyonu durdurmak için 500 µL %10'luk TCA eklenmiş ve 15 dk oda sıcaklığında bekletme işlemi yapıldıktan sonra tüplere 500 µL renklendirme çözeltisi ilave edilmiştir. 15 dakika inkübasyondan sonra 3200 rpm' de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra örnekler köre karşı 700 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Demir *et al.* 2018).

Canlı bakteri sayımı

M17 ve MRS Agar ile 9 ml'lik fidilisyon sıvıları hazırlanmıştır. Her bir bakteri için 7 adet tüp deney tüplüğüne konularak 1'den 7'e kadar numaralandırılmıştır. Sayım yapılacak bakteri kültüründen otomatik pipetle alınan 1 ml/gr örnek 1 nolu tüpe aktarılmıştır. Bu tüp iyice karıştırılmış ve tekrar pipetle alınan 1 ml örnek 2 nolu tüpe aktarılmıştır. Bu işleme 7 nolu tüpe kadar devam edilmiş ve her bir dilisyondan ayrı ayrı 100 µl örnek alınarak M17 ve MRS Agar

içeren petrilere aktarılmıştır. Steril cam baget yardımı ile besiyeri üzerine iyice yayılmış ve her bir bakteriye ait her bir dilisyondan 3 petriye ekim yapılmıştır. Kültürler 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmış ve tek tek kolonilerin sayılabildiği en uygun dilisyondan sayım yapılmıştır. Burada sayım yapılacak petrilerde ortalama olarak en az 30-40 en çok 200-250 koloni olmasına dikkat edilmiştir. Bakteri sayımları üç tekrarlı yapılıp ortalaması alınarak belirlenmiştir. Sayımın yapıldığı dilisyon katsayısı ile çarpılarak toplam sayı (koloni oluşturan birim: kob) bulunmuştur (Şenol Kotan 2020). % canlılık uygulamadaki canlı bakteri sayısı kontroldeki canlı bakteri sayısına bölünerek belirlenmiştir.

ARAŞTIRMA BULGULARI

Suşların probiyotik özelliklerinin in vitro koşullarda belirlenmesi

Asit dirençliliğinin belirlenmesi

E. faecium, L. lactis ve *L.casei* suşları pH 2,0, 2,5 ve 3,0' da asit toleransı açısından test edilmiş ve pH 7.0'daki büyüme kontrol olarak değerlendirilmiştir (Tablo 1). Bulgulara göre, *E. faecium, L. lactis ve L. casei* suşları 3 saat asidik ortama maruz kaldıktan sonra pH 2,0'de canlılık göstermezken pH 2,5'te, *E. faecium* %5, *L. lactis* %8 *ve L.casei* %7 pH 3,0'da sırasıyla %18 %20 ve %16 oranında bir canlılık göstermişlerdir.

Tablo 1. Asidik Ortamda

Zaman		**3s**	
PH	**2**	**2.5**	**3**
İzolat	**% canlılık**	**% canlılık**	**% canlılık**
E. faecium	0	5	18
L. lactis	0	8	20
L. casei	0	7	16

Safra tuzuna toleransın belirlenmesi

Suşların safra toleransı, 3 saat süre ile farklı safra tuzu konsantrasyonlarına (%0,3-0,5, 0,1,1,5) maruz bırakıldıktan sonra belirlenmiştir (Tablo 2). *E. faecium* suşu en düşük safra konsantrasyonu olan %0,3 te %94 oranında canlılık gösterirken, %0,5, %1 ve %1,5 te ise sırasıyla %50, %47 ve %20 oranlarında canlılık göstermiştir. *L. lactis* suşu safra tuzuna 3 saat maruz kaldıktan sonra en düşük safra konsantrasyonunda (%0,3) %19 oranında bir canlılık gösterirken %0,5, %1 ve %1,5 te ise sırasıyla %11,2, %9 ve %8,7 oranlarında canlılık göstermiştir. *L. casei* suşu ise 3 saatlik inkübasyon sonrası en düşük safra konsantrasyonun da %19,6 oranında, %0,5 te ise %5 oranında hayatta kalmıştır. Suş %1 ve %1,5 safra tuzunda canlılık göstermemiştir.

Tablo 2. Farklı Safra Tuzu Konsantrasyonuna Karşı Bakterilerin % Canlılık Oranları

İzolat	Safra Tuzu (%)			
	0.3	**0.5**	**1.0**	**1.5**
	% canlılık	**% canlılık**	**% canlılık**	**% canlılık**
E. faecium	94,4	50,0	47,2	20,0
L. lactis	19,0	11,2	9,0	8,7
L. casei	19,6	5	0	0

Pepsine karşı gelişimin belirlenmesi

İzolatların (*E. faecium, L. lactis ve L. casei*) pepsine karşı direnci iki farklı pH da (2,0 ve 3,0) ve üç farklı saatte (0, 1 ve 3 saat) test edilmiş ve sonuçlar Tablo 3'te sunulmuştur. *E. faecium* pepsin varlığında pH 2,0 da 0. Saatte %74 oranında canlılık gösterirken, 1. ve 3. saatin sonunda canlılık göstermemiştir. Suş pH 3'te ise 0., 1. ve 3. saatlerde sırasıyla %66, %42, %14 oranlarında sağkalım göstermiştir. *L. lactis* suşu pH 2,0 da pepsin varlığında 0. saatte % 66 oranında, 1. saatin sonunda ise %4 oranında sağkalım gösterirken, 3. saatin sonunda canlılık göstermemiştir. pH 3 te ise 0. saatte %100 lük bir canlılık, 1. saatin sonunda ise % 5 lik bir canlılık ölçülmüştür. Suş 3. Saatin sonunda canlılık göstermemiştir. *L. casei* pepsinli ortamda pH 2,0 da canlılık göstermezken, pH 3,0 da ise 0., 1. ve 3. saatin sonunda sırasıyla %22, %11 ve %10'luk bir canlılık göstermiştir.

Tablo 3. Pepsine Karşı İzolatların Canlılık Oranları

İzolat	**Zaman (saat)**					
	0		**1**		**3**	
	pH 2	**pH 3**	**pH 2**	**pH 3**	**pH 2**	**pH 3**
	% Canlılık					
E. faecium	74	66	0	42	0	14
L. lactis	66	100	4	5	0	0
L. casei	0	22	0	11	0	10

Pankreatine karşı gelişimin belirlenmesi

Bakterilerin pankreatine karşı gelişimi pH 8,0 da 1 mg/mL pankreatin içeren besi ortamında başlangıç ve 4. saatte belirlenmiştir (Tablo 4). *E. faecium* pankteatinli ortamda 0. satte %100 oranında canlı kalırken 4. saatin sonunda %82 oranında canlı kalmıştır. *L. lactis* suşunun pankteatinli ortamda pH 8,0'da başlangıç saatinde %96 oranında 4. Saatin sonunda ise

%89 oranında canlı kaldığı belirlenmiştir. *L. casei* başlangıçta %87 ve 4. Saatin sonunda ise %79 oranında sağkalım göstermiştir.

Tablo 4. Pankreatine Karşı İzolatların Canlılık Oranları

İzolat	**Zaman**	
	0. Saat	**4. Saat**
	% Canlılık	
E. faecium	100	82
L. lactis	96	89
L. casei	87	79

Lizozim toleransının belirlenmesi

Suşların lizozim toleransı 100 mg/L lizozim içeren ortamlarda iki farklı saatte (başlangıç ve 90 dk) belirlenmiştir. *E. faecium* lizozim içeren ortamda başlangıçta % 63'lük, 90 dk sonunda % 43'lük bir canlılık göstemiştir. *L. lactis* suşu ise başlangıçta % 90 oranında canlı kalırken, 90 dk sonunda ise % 26 oranında canlı kalmıştır. *L. casei* lizozimli ortamda başlangıçta % 100 oranında canlılık gösterirken 90 dk sonunda % 83 oranında canlılığını korumuştur (Tablo 5).

Tablo 5. Lizozim Enzimine Karşı İzolatların Canlılık Oranları

İzolat	**Zaman**	
	Başlangıç	**90. dakika**
	% Canlılık	
E. faecium	63	43
L. lactis	90	26
L. casei	100	83

Fenol direncinin belirlenmesi

E. faecium suşu 37 °C'de 48 saatlik inkübasyondan sonra % 0,3 fenolü tolere edebildiği ve % 100 oranında canlı kalabildiği bulunmuştur. *L. lactis* suşu 48. saatin sonunda % 0,3 fenolü tolere ederek % 100 oranında canlılık göstermiştir. *L. casei'*nin ise başlangıç ve 48. saatte % 0,3 fenolde %100 oranında canlılık sergilemiştir (Tablo 6).

Tablo 6. Fenole Karşı İzolatların Canlılık Oranları

İzolat	Zaman	
	Başlangıç	48. Saat
	% Canlılık	
E. faecium	76	100
L. lactis	100	100
L. casei	100	100

Bakterilerin antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının belirlenmesi

Çalışmada 13 antibiyotik ile suşların direnç profilleri belirlenmiş ve sonuçlar Tablo 7'de sunulmuştur. *E. faecium*'un sırasıyla gentamicin (8,0±0,0 mm), meropenem (10,0±2.0 mm) ve bacitracine (12,7±2,5) dirençli, teicoplanin (16,7±0,6 mm) ve penicilline (18,3±1,5 mm) karşı orta dirençli, vancomycin (27,7±1,1 mm) ve Tablo 7'deki diğer antibiyotiklere karşı ise duyarlı olduğu belirlenmiştir. *L. lactis*' in gentamicin (13,7±1,2 mm) ve rifampine (7,3±0,6 mm) karşı dirençli, vancomycin (30,0±1,0 mm) ve diğer 10 antibiyotiğe karşı duyarlı olduğu gözlemlenmiştir. Vancomycin (6,0±0,0), teicoplanin (6,3±0,6), gentamicin (7,3±0,6) ve ceflazidime (8,7±3,1) antibiyotikleri *L. casei'*ye karşı düşük bir zon çapı oluşturmuş ve suşun bu antibiyotiklere dirençli olduğu belirlenmiştir. Tablo 7' de yer alan diğer antibiyotikler *L. casei*'ye karşı iyi bir zon çapı oluşturmuş ve suşun bu antibiyotiklere karşı duyarlı olduğu gözlemlenmiştir.

Tablo 7. İzolatların 13 Farklı Antibiyotiğe Karşı Göstermiş Oldukları Zon Değerleri

Antibiyotik	Zon Çapı (mm)±SD (Antibiyotik Duyarlık Paterni)		
	E. faecium	***L. lactis***	***L. casei***
Ampicillin (10 µg)	22,7±0,6 (S)	28,7±1,5 (S)	29,0±1,7 (S)
Bacitracin (10 unit)	12,7±2,5 (R)	21,0±1,0 (S)	19,3±0,6 (I)
Ceflazidime (10 µg)	60,0±0,0 (S)	29,0±1,0 (S)	8,7±3,1 (R)
Erythromycin (15 µg)	20,0±0,0 (S)	33,7±1,2 (S)	36,7±3,1 (S)
Gentamicin (10 µg)	8,0±0,0 (R)	13,7±1,2 (R)	7,3±0,6 (R)
Meropenem (10 µg)	10,0±2.0 (R)	33,3±1,5 (S)	30,0±1,0 (S)
Penicillin (10 unit)	18,3±1,5 (I)	25,7±3,1 (S)	26,3±1,5 (S)
Piperacilin (100 µg)	21,0±1,0 (S)	26,3±1,5 (S)	44,3±2,9 (S)
Rifampin (5 µg)	30,3±0,6 (S)	7,3±0,6 (R)	44,0±1,0 (S)
Teicoplanin (30 µg)	16,7±0,6 (I)	28,0±1,7 (S)	6,3±0,6 (R)
Tetracycline (30 µg)	29,7±0,6 (S)	28,7± 0,6 (S)	38,0±1,0 (S)
Trimethoprim (5 µg)	35,0±3,0 (S)	60,0±0,0 (S)	34,7±2,1 (S)
Vancomycin (30 µg)	27,7±1,2 (S)	30,0±1,0 (S)	6,0±0,0 (R)

S, duyarlı; **I**, orta; **R**, dirençli

Bazı patojen mikroorganizmalara karşı antagonostik etkilerin belirlenmesi

E. faecium, L. lactis ve L. casei suşları yaygın enterik patojenlere (*Pseudomonas aeruginosa* (RK-481), *Bacillus subtilis* (RK-483), *Staphylococcus aureus* (RK-484), *Salmonella enteritidis* (RK-485), *Bacillus cereus* ve *Enterococcus faecalis* (RK-487)) karşı inhibitör etkisi açısından test edilmiştir. *E. faecium*, *P. aeruginosa, B. subtilis* ve *S. enteritidis*'e karşı güçlü bir inhibisyon zonu oluşturmuş ve *B. cereus* dışında tüm patojenlere karşı inhibitör etki göstermiştir. *L. lactis* suşu *Bacillus subtilis* RK-483'e karşı iyi, *Staphylococcus aureus* RK-484'e karşı zayıf bir zon çapı oluşturmuş ve Tablo 8'deki diğer patojenlere karşı herhangi bir zon oluşturmamıştır. *L. casei* ise *B. cereus* dışındaki patojenlere karşı zayıf bir zon bölgesi oluşturmuştur.

Tablo 8. İzolatların Bazı Patojen Mikroorganizmalara Karşı Antagonostik Etkileri

Patojen mikroorganizma	***E. faecium***	***L. lactis***	***L. casei***
Pseudomonas aeruginosa (RK-481)	+++	-	+
Bacillus subtilis (RK-483)	+++	++	+
Staphylococcus aureus (RK-484)	++	+	+
Salmonella enteritidis (RK-485)	+++	-	+
Bacillus cereus	-	-	-
Enterococcus faecalis (RK-487)	+++	-	+

-, Engelleme yok; +, 0 ve 3 mm çapında (zayıf) inhibisyon bölgesi; ++, 3 ila 6 mm çapında inhibisyon bölgesi (iyi); +++, 6 mm çaptan daha büyük (güçlü) inhibisyon bölgesi

Bakteriosin veya bakteriosin benzeri maddelerin inhibitör etkisinin belirlenmesi

*E. faecium, L. lactis ve L. casei'*nin bakteriosin veya bakteriosin benzeri maddelerinin enterik patojenlere (*Pseudomonas aeruginosa* (RK-481), *Bacillus subtilis* (RK-483), *Staphylococcus aureus* (RK-484), *Salmonella enteritidis* (RK-485), *Bacillus cereus* ve *Enterococcus faecalis* (RK-487)) karşı inhibitör etkileri suşların süpernatanları kullanılarak test edilmiştir. *E. faecium*'un süpernatantı uygulama yapılan patojenlere karşı zon oluşturmamıştır. *L. lactis* suşunun süpernatantı ise *P. aeruginosa* (RK-481) ve *B. subtilis* (RK-483)'e karşı zayıf bir zon oluşturmuş ve Tablo 9' da yer alan diğer patojenlere karşı etkili olmamıştır. *L.* casei'nin süpernatantı *S. enteritidis* (RK-485), *B. cereus* ve *E. faecalis* (RK-487)'e karşı güçlü, *S. aureus* (RK-484)'a karşı zayıf ise bir zon çapı oluşturmuştur. *P. aeruginosa* (RK-481) ve *B. subtilis* (RK-483)' e karşı herhangi bir etki göstermemiştir.

Tablo 9. Bakteriosin veya Bakteriosin Benzeri Maddelerin İnhibitör Etkisi

Patojen mikroorganizma	*E. faecium*	*L. lactis*	*L. casei*
Pseudomonas aeruginosa (RK-481)	-	+	-
Bacillus subtilis (RK-483)	-	+	-
Staphylococcus aureus (RK-484)	-	-	+
Salmonella enteritidis (RK-485)	-	-	+++
Bacillus cereus	-	-	+++
Enterococcus faecalis (RK-487)	-	-	+++

-, Engelleme yok; +, 0 ve 3 mm çapında (zayıf) inhibisyon bölgesi; ++, 3 ila 6 mm çapında inhibisyon bölgesi (iyi); +++, 6 mm çaptan daha büyük (güçlü) inhibisyon bölgesi.

Otoagregasyon ve koagregasyon özelliklerinin belirlenmesi

Suşların otoagregasyon ve koagregasyon özellikleri 2 ve 5 saatlik inkübasyon sonrası verilen formül kullarılarak belirlenmiştir. *E. faecium*'un oto-agregasyon yüzdesi 2 ve 5 saatlik inkübasyondan sonra sırasıyla % 95,83 ve % 97 olarak, *E.coli* ile ko-agregasyon yüzdesi ise % 19,17 olarak belirlenmiştir. *L. lactis*'in 2 ve 5 saatlik inkübasyon sonrası oto-agregasyon yüzdesi sırasıyla % 36,95 ve % 39,13 olarak, *E.coli* ile ko-agregasyon yüzdesi ise % 16,3 olarak belirlenmiştir. *L. casei*'nin oto-agregasyon yüzdesi ise 2 ve 5 saatlik inkübasyon sonrası sırasıyla % 81,42 ve % 57,14 olarak, ko-agregasyon yüzdesi ise % 21,2 olarak belirlenmiştir (Tablo 10).

Tablo 10. İzolatların Otoagregasyon ve Koagregasyon Yüzdeleri

İzolat	Oto-agregasyon (%)		Ko-agregasyon (%)
	2. Saat	5. Saat	*E.coli*
E.faecium	95,83	97	19,17
L. lactis	36,95	39,13	16,3
L. casei	81,42	57,14	21,2

Sindirim sistemi modellemesi

Sindirim sistemi modellemesinde, her bir bakteri için optimum sıcaklık değerinde 3 saat inkübe edildikten sonra pH 3-8'de başlangıç ve 3. saatlerinde canlı bakteri sayımları yapılmıştır (Tablo 11). *E. faecium* başlangıç koşullarında %82 canlılık gösterirken 3. saat sonraki gözlemde canlılığı %72 olarak ölçülmüştür. *L. lactis* başlangıç koşullarında %66 canlı kalırken 3 saat sonra canlılık oranı %55 olarak ölçülmüştür. *L.casei* diğer iki bakteriye kıyasla daha düşük canlılık oranına sahiptir. Başlangıçta %38 olan canlılık oranı daha sonra %34 olarak ölçülmüştür. Modellemenin devamında; suşlar pH'sı 8.0 olan PBS tampununda 4 saat inkübe

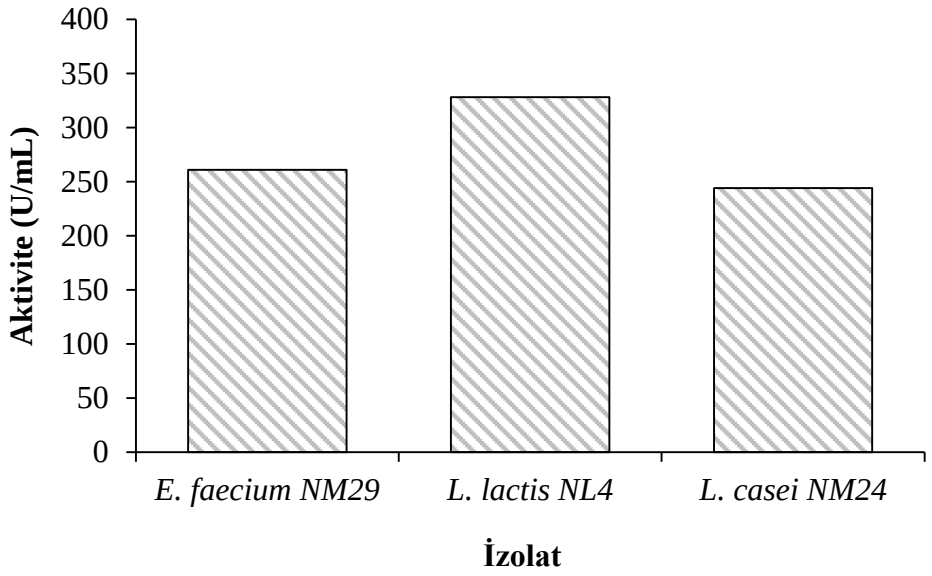
edilmiş, başlangıç ve 4. saate canlı bakteri sayımları yapılmıştır alınan sonuçlarda canlılığını sürdürebilen izolat *L. lactis* olmuştur. Başlangıçta %16 olan canlılık seviyesi 4. saaatin sonunda %9 olarak ölçülmüştür.

Tablo 11. Sindirim Sistemi Modelinde İzolatların Canlılık Yüzdesi

İzolat	**pH 3**		**pH 8**	
	0.saat	**3.saat**	**0.saat**	**4.saat**
	Canlılık %	**Canlılık%**	**Canlılık%**	**Canlılık%**
E. faecium	82	72	0	0
L. lactis	66	55	16	9
L. casei	38	34	0	0

Bakterilerin fitaz aktivitesinin belirlenmesi

Uygun koşullar altında sıvı besiyerinde geliştirilen izolatlardan 1000 µL alınarak 2 ml lik tüplere konulmuş ve +4 °C'de 9000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra çökelti kısım atılarak süpernatant kısımdan enzim aktivitesi belirlenmiştir. Suşların (*E. faecium, L. lactis* ve *L. casei*) fitaz aktiviteleri sırasıyla 261 U/mL, 328 U/mL ve 244 U/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. Bakterilerin fitaz aktivite sonuçları

TARTIŞMA VE SONUÇ

Probiyotik suşlarının bağırsaklarda önerilen faydaları göstermeden önce mide ve safra tuzu asidi gibi gastrointestinal sistemin (GIT) zorlu koşullarına karşı tolerans göstermeleri son derece önemlidir (Kim *et al.* 2019; Abiad *et al.* 2022; Alameri *et al.* 2022). Asit toleransı, probiyotik bakterilerin mide gibi asidik bir ortamda hayatta kalma kabiliyetini, safra toleransı ise ince bağırsakta safra tuzlarının varlığında metabolik aktivitesini ve probiyotik olarak işlevsel rolünü ifade etmektedir (Silva de Ruiz *et al.* 2003; Ayyash *et al.* 2021).

Çalışmada izolatlar (*E. faecium, L. lactis ve L.casei*) pH 2.0, 2.5 ve 3.0' da asit toleransı açısından test edilmiş ve pH 7.0'daki büyüme kontrol olarak değerlendirilmiştir. Bulgularımıza göre, suşlarımız 3 saat asidik ortama maruz kaldıktan sonra başlangıç pH değerleri 7.0 olan MRS/M17 sıvısında iyi bir büyüme gösterirken, asidik pH değerinde (2.0) canlılık göstermemişlerdir. pH 2,5' te *E. faecium* % 5*, L. lactis* %8 ve *L.casei* %7 oranında bir canlılık göstermiştir. pH 3.0'da ise sırasıyla *E. faecium* %18*, L. lactis* % 20 ve *L.casei* % 16 oranında bir canlılık ölçülmüştür.

Safra tuzları, yüzey proteinlerini denatüre ederek, bakterinin hücre zarının yapısını bozarak üremesini engeller (Urdaneta and Casadesús 2017). Safra tuzlarına karşı direnç, probiyotik suşların seçiminde en önemli kriterlerden biridir. Çünkü ince bağırsak ve kolon yüksek konsantrasyonlarda safra tuzu içerir. Bu nedenle, probiyotik bakterilerin etkili olabilmesi için oksbilenin %0,15-0,3'ünde üreyebilmesi önemlidir (Giraffa 2003; Ahmadova *et al.* 2013). Probiyotik suşların seçiminde ayırt edici özellik olarak % 0,3 safra tuzu direnci vurgulanmıştır (Klingberg *et al.* 2005; Yerlikaya and Akbulut 2020). Çalışmada suşların safra toleransı, 3 saat süre ile farklı safra tuzu konsantrasyonlarına (%0,3-0,5, 0,1,1,5) maruz bırakıldıktan sonra belirlenmiştir. *E. faecium* suşu, Tablo 1'de gösterildiği gibi safra tuzunun çeşitli konsantrasyonlarına tolerans geliştirmiştir. Safraya 3 saat maruz kaldıktan sonra en düşük safra konsantrasyonunda %94'lük bir hayatta kalma gösterirken, en yüksek safra konsantrasyonu olan %1,5 te ise %20 oranında bir canlılık sergilemiştir. Safra tuzu konsantrasyonu arttıkça bu suşun canlılığında bir azalma gözlenmiştir. Papamanoli *et al.* (2003), Oxgall konsantrasyonunun %0,1–2,0 aralığında beş farklı konsantrasyonu üzerine yaptıkları çalışmada, %0,3 konsantrasyonda kültürün yaşaması açısından farklılıklar olduğunu bildirmişler ve %0,3 konsantrasyon değerinin probiyotik bakteri taraması sırasında kritik konsantrasyon olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Klingberg *et al.* (2005) safra tuzunun

%0,3'ünün inhibisyona yol açabileceğini, ancak test edilen kültürlerin en az %86'sının probiyotik özellik gösterecek kadar hayatta kaldığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda tercih ettiğimiz safra tuzu oranları yüksek seçilmiş ve üreme görülmüştür. Literatür kapsamında verilen diğer değerler ile paralellik göstermektedir (Rajput *et al.* 2022). Suşumuzun probiyotik bakteri taraması sırasında kritik konsantrasyon olarak değerlendirilen %0,3 safra tuzunda yüksek bir canlılık göstererek safra tuzu toleransı açısından yüksek bir değere sahip olduğu belirlenmiştir.

L. lactis safra tuzuna 3 saat maruz kaldıktan sonra %0,3 safra konsantrasyonunda %19' luk bir hayatta kalma gösterirken, en yüksek safra konsantrasyonu olan %1,5 te ise % 8,7 oranında bir canlılık Sergilemiştir. Sonuçlarımıza benzer olarak, Todorova *et al.* (2007) ise insan vajinal sekresyonlarından izole ettikleri *L. lactis* suşlarının %0,3 safra tuzu varlığında üreyebildiğini bildirmiştir. *Lactococcus lactis* KUMS-T18'in %0,3 safra tuzunda 4 saatlik inkübasyondan sonra %99 oranında bir sağkalım gösterdiği (Kiani *et al.* 2021), *Lactococcus lactis* Gh1'in ise inkübasyon süresi boyunca kontrol kültürüne (%120-162) benzer sağkalım yüzdesi (%113-171) ile %0,3 (a/h) safra tuzuna dirençli olduğu rapor edilmiştir (Jawan *et al.* 2021). Ayrıca mevcut çalışmada elde edilen verilerin aksine çiğ süt ve kefir danelerinden izole edilen 14 farklı *L. lactis* suşunun %0,3, 0,50, 1 ve 2 oranında safra tuzu varlığında büyüme göstermediği rapor edilmiştir (Yerlikaya 2019). Sonuç olarak, *L. lactis* NL-4 suşu literatürde yer alan diğer *L. lactis* suşları ile benzer bir safra tuzu toleransı göstermiştir.

L. casei %0,3 safra tuzuna 3 saat maruz kaldıktan sonra %19,6 lık bir sağkalım gösterirken, yüksek safra konsantrasyonlarında (%1 ve 1,5) canlılık göstermemiştir. *L. casei* MYSRD 108 suşu %0,3 safra tuzu konsantrasyonunda 5 saatlik inkübasyondan sonra suşumuzdan çok daha yüksek bir hayatta kalma oranı (%50) göstermiştir (Divyashree *et al.* 2021). Benzer şekilde *L. casei* Rosell-215 suşu % 4,0 oranındaki safra tuzunu tolere ederek % 30,8 oranında bir sağkalım göstermiştir (Hamon *et al.* 2012). Safra tuzu konsantrasyonu arttıkça büyüme hızının azaldığı yapılan çalışmalarda da rapor edilmiştir (Hamon *et al.* 2012; Divyashree *et al.* 2021). Suşumuz literatürde var olan diğer suşlar ile karşılaştırıldığında %0,3 safra tuzunda daha düşük bir canlılık göstermiştir.

Her üç suş dikkate alındığında *E. faecium*' un farklı safra tuzu konsantrasyonlarına karşı daha dirençli olduğu, onu *L. lactis* suşunun takip ettiği ve *L. casei*'nin ise tolerans oranının düşük olduğu belirlenmiştir.

Sindirim enzimlerine tolerans, bir probiyotik suşun potansiyelini değerlendirirken dikkate alınması gereken faktörden biridir. Pankreatin ve pepsin, sırasıyla pankreas ve midede üretilen ve proteinleri daha küçük peptidlere ve amino asitlere ayırmaya yardımcı olan sindirim

enzimleridir (Taheur *et al.* 2016). Bu enzimlere karşı direnç, midenin asidik ve ince bağırsağın proteolitik ortamında hayatta kalmalarını sağladığından dolayı probiyotik bakterilerde aranan özelliklerdendir (Rönkä *et al.* 2003; Taheur *et al.* 2016, Wendel 2022). Suşların (*E. faecium, L. lactis ve L.casei*) probiyotik gücünü belirlemek için pepsine karşı dirençleri iki farklı pH (pH 2,0 ve 3,0) 'da ve üç farklı saatte (0,1 ve 3s), pankreatine karşı dirençleri ise pH 8,0'da ve iki farklı saatte (0 ve 4 s)test edilmiştir. *E. faecium* pepsin varlığında 3. saatin sonunda pH 2,0 da hayatta kalmazken, pH 3,0 da %14'lük bir hayatta kalma oranı göstermiştir. *E. faecium* pH 8'de 4. saatin sonunda %82'lik bir canlılıkla pankreatine karşı iyi bir direnç sergilemiştir. Hosseini *et al.* (2009) *E. faecium*'un suşlarının sırasıyla pepsini tolere edebildiğini bildirmişlerdir. *L. lactis* 3. saatin sonunda pepsinli ortamda (pH 2,0-3,0) canlılık göstermezken, *L. casei* suşu pH 3'te % 10'luk bir canlılık göstermiştir. Rubio *et al.* (2014) yaptıkları çalışmada *L. fermentum*, *L. casei, L. paracasei* ve *L. rhamnosus* suşlarının probiotik özelliklerini incelemiş ve tüm laktobasil suşlarının MRS Oxgall agarda üreyebildini bildirmiştir. Pankreatine toleransla ilgili olarak, test edilen Lactobacillerin çoğunun 3 saatlik muameleden sonra dirençli oldukları bildirilmiştir. Sadece *L. gasseri* CTC1698, *L. fermentum* CTC1694 ve *L. vaginalis* CTC1710, pankreatinde 3 saatlik inkübasyondan sonra >1 log CFU/g düşüş gösterdiği bildirilmiştir. Rönkä *et al.* (2003) *L. brevis* suşunun hayatta kalma oranının pankreatik enzimlerin mevcudiyetinde biraz azaldığını bildirmiştir. Ruiz-Moyano *et al.* (2008) ise test edilen Lactobacillus suşlarının %90'dan fazlasının pankreatik enzimlerle 3 saatlik muameleden sonra hayatta kaldığını bildirmişlerdir. Soltani *et al.* (2022) çalışılan her iki *Lactobacillus* türününde pankreas enzimlerine karşı uygun bir tolerans sergilediği rapor etmişlerdir. Mansour *et al.* (2014) yaptıkları çalışmada, *E. faecium* NM113, *E. faecium* NM213 ve *L. casei* NM512 suşlarının pankreatik enzimlerin varlığında 3 saat boyunca hayatta kaldıkları bildirilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar dikkate alında pepsin ve pankreatin direnci bakımından en dirençli suş *E.faecium* olarak belirlenmiş ve onu sırasıyla *L. lactis* ve *L. casei* takip etmiştir.

Lizozim enzimi (EC 3.2.1.17), tüm memelilerin gözyaşı, tükürük ve sütünde salgılanan doğal olarak oluşan bir antimikrobiyal proteindir. Lizozim, öncelikle gram-pozitif bakterilere karşı etkili olan bir peptidoglikan N-asetil-muramoilhidrolazdır. Lizozim, bakterilerin hücre duvarının peptidoglikan bileşenini hidrolize eder ve böylece hücreyi parçalar (Scharfen *et al.* 2007). Bu nedenle, lizozim ile mücadele etmek, probiyotiklerin karakteristik bir özelliği olarak kabul edilebilir. *E. faecium* lizozim ile 0 ve 90 dakikalık inkübasyonundan sonra sırasıyla % 63 ve % 43 oranında canlılık göstermiş ve süreyle orantılı olarak canlılık azalmıştır. Singhal *et al.* (2019) rizosferden izole ettikleri 5 *E. faecium* suşunun lizozime (100 mg/L) karşı yüksek tolerans gösterdiğini ve ortalama hayatta kalma yüzdelerinin 2 saatlik inkübasyondan sonra bile %75-80 olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer şekilde *Enterococcus faecium* MC-5 suşunun 24

saatlik inkübasyondan sonra sırasıyla 100, 200 ve 300 µg/mL'lik lizozim konsantrasyonlarına karşı iyi bir direnç gösterdiği belirtilmiştir (Tilwani *et al.* 2022). Çeşitli *E. faecium* türleri üzerinde yapılan önceki çalışmalarda da sonuçlarımıza paralel olarak suşların lizozime karşı dirençli olduğu bildirilmiştir.

L. lactis suşu başlangıçta % 90 oranında canlı kalırken, 90 dk sonunda ise %26 oranında canlı kalmıştır. *L. casei* 100 mg/L lizozimli ortamda başlangıçta %100 oranında canlılık gösterirken 90 dk sonunda canlık %17 oranında azalmıştır. Bir izolatın iyi bir probiyotik olabilmesi için bu enzime tolerans göstermesi gerekir. Hernández *et al.* (2023) yaptıkları bir çalışmada; *Lactobacillus fermentum* ve *Lactobacillus arizonensisort* bakterilerini 60-120 dakika boyunca lizozime karşı test etmişler ve sırasıyla %95'in üzerinde ve %50-65 arasında hayatta kalma değerleri gösterdiklerini bildirmişlerdir. Senjaliya and George (2023), *Lactobacillus plantarum* CMGC2 ve CMJC7 suşlarının probiyotik özelliklerini in vitro olarak test ettikleri çalışmada suşların lizozim toleranslarını CMGC2 için %95,79, CMJC7 için %85,69 olarak belirlemiş ve her iki izolatında 1,0 mg/mL lizozime direnç segilediğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda kullanılan her iki suş yüksek tolerans göstermiş ve yapılan diğer laktikasit bakterileri ise temelde benzer tolerans sergiledikleri belirlenmiştir.

Aromatik endojen proteinlerden sindirim işlemi sırasında sentezlenen fenoller toksik metabolitlerdir (Tilwani *et al.* 2022). Fenoller ve ara türevleri, LAB'ne karşı bakterisidal etki gösterebilir. Bu nedenle, belirli bir probiyotik LAB'nin, GIT'de bulunan fenolleri tolere edebilmeleri açısından test edilmesi zorunludur (de Souza *et al.* 2019). Çalışmamızda, *E. faecium* suşunun 48 saatlik inkübasyondan sonra % 100 oranında canlı kalabildiği ve % 0,3 fenolü tolere edebildiği belirlenmiştir. *E. faecium* için benzer sonuçlar, 37 °C'de 24 saat farklı fenol konsantrasyonlarında (%0,25, 0,40 ve 0,50) gözlenmiş ve bakterinin farklı fenol konsantrasyonlarında hayatta kaldığı rapor edilmiştir (Vassos *et al.* 2009; Siddique *et al.* 2021). *E. faecium* MC-5 suşunun ise 37 ˚C'de 24 saat inkübasyondan sonra %0,25 ve %0,5 fenole dayanabildiği belirlenmiş ve fenol konsantrasyonu arttıkça canlılığın azaldığı bildirilmiştir (Tilwani *et al.* 2022). Yapılan çalışmalar dikkate alındığında suşumuz *E. faecium* NM-29'un farklı kaynaklardan izole edilen *E. faecium* izolatları ile benzer bir fenol toleransı gösterdiği görülmektedir. *L. lactis* suşu 48 saatlik inkübasyon sonunda % 0,3 fenolü tolere ederek % 100 oranında canlılık göstermiştir. *L. casei* ise başlangıç ve 48. saatte % 0,3 fenolde %100 oranında canlılık sergilemiştir. Çalışmamıza benzer olarak, Reuben *et al.* (2020) *L. casei* C3 suşunun % 0,4 fenole tolerans gösterdiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca *L. lactis* Gh1 suşunun 24 saatlik inkübasyonun ardından % 0,4 (w/v) fenolü (Jawan *et al.* 2021), *L. lactis* LNH70'in ise 24 saat boyunca % 0,3 fenolü tolere edebildiği belirtilmiştir (Nageshwar *et al.* 2022). Çalışmada elde

edilen sonuçlar ve literatür verileri dikkate alındığında *L. lactis* suşlarının genel olarak fenolü tolere edebilme yeteneğine sahip olduğu görülmektedir.

Bir bakteri suşunun antibiyotik duyarlılığının test edilmesi, onun insan ve hayvan beslenmesinde güvenli olarak kullanılabilmesi için önemli bir ön koşuldur (Dixit *et al.* 2013). Enterococ'ların probiyotik olarak değerlendirilmesinde en önemli konulardan biri antibiyotik direnci, özellikle vankomisin direncidir. Gıda kaynaklı enterococ suşları genellikle klinik olarak ilgili antibiyotiklere (ampisilin, vankomisin ve gentamisin) duyarlıdır (Hugas *et al.* 2003; Foulquié Moreno *et al.* 2006).

Çalışmada *E.faecium*'un gentamicin (8,0±0,0 mm), meropenem (10,0±2,0 mm) ve bacitracine (12,7±2,5) dirençli olduğu belirlenmiştir. Diğer antibiyotiklerle ilgili olarak, teicoplanin (16,7±0,6 mm) ve penicilline (18,3±1,5 mm) karşı orta dirençli, vancomycin (27,7±1,1 mm) ve uygulama yapılan diğer antibiyotiklere karşı ise duyarlı olduğu belirlenmiştir. Antimikrobiyallere karşı benzer bir duyarlılık profili Ahmadova *et al.* (2013) tarafından yapılan çalışmada elde edilmiş, *E faecium* AQ71 suşunun ampisilin, tetrasiklin ve vankomisine karşı duyarlı olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde Zommiti *et al.* (2018) beş *E faecium* suşunun hepsinin ampisiline, kloramfenikol ve vankomisine, duyarlı olduğunu ancak eritromisin ve ofloksasine karşı direnç gösterdiğini açıklamıştır. *E faecium* MC-5 suşunun vankomisin, kanamisin, eritromisin ve diğer çeşitli ticari klinik antibiyotiklere karşı duyarlılık, sefazolin, nalidiksik asit, metisilin ve trimetoprim'e karşı direnç gösterdiği rapor edilmiştir (Tilwani *et al.* 2022). Yapılan çalışmalardan farklı olarak suşumuz gentamicin, meropenem ve bacitracine dirençli bulunmuştur.

L. lactis' in gentamicin (13,7±1,2 mm) ve rifampine (7,3±0,6 mm) karşı dirençli, vancomycin (30,0±1,0 mm) ve diğer 10 antibiyotiğe karşı duyarlı olduğu gözlemlenmiştir. Vasiee *et al.* (2019), recombinant *Lactococcus lactis* NZ1330'un hiçbir antibiyotiğe direnç göstermediğini, Mortezaei *et al.* (2020) ise *L. lactis* NABRII49, NABRII64, NABRII66, NABRII61 ve NABRII49 suşlarının tetrasikline direnç gösterdiğini bildirmişlerdir. Vancomycin (6,0±0,0), teicoplanin (6,3±0,6), gentamicin (7,3±0,6) ve ceflazidime (8,7±3,1) antibiyotikleri *L. casei'* ye karşı düşük bir zon çapı oluşturmuş ve suşun bu antibiyotiklere dirençli olduğu belirlenmiştir. Test edilen diğer antibiyotikler *L. casei*'ye karşı iyi bir zon çapı oluşturmuş ve suşun bu antibiyotiklere karşı duyarlı olduğu gözlemlenmiştir. Sonuçlarımıza benzer olarak peynirden izole edilen *L. casei* suşunun ampicillin, vancomycin, oxacillin, cephalothin, cefodizime ve tobramycine dirençli olduğu rapor edilmiştir (Turgay and Erbilir 2006). Vankomisin ile yapılan çalışmalar da genel olarak laktik asit bakterilerinin Vankomisine karşı dirençli olduğunu göstermektedir (Lee *et al.* 2016; Banerjee *et al.* 2017)

Probiyotiklerde aranan ön koşullardan biri antimikrobiyal aktivitenin varlığıdır (Silva *et al.* 2020). Antimikrobiyal aktivite, probiyotiklerin patojen kolonizasyonunu baskılamalarına, immün sistemi modüle etmelerine ve antiinflamatuar aktivite sergilemelerine olanak sağladığı için önemli bir gerekliliktir (Denkova *et al.* 2017). *E. faecium*, *L. lactis* ve *L. casei* yaygın enterik patojenlere ((*Pseudomonas aeruginosa* (RK-481), *Bacillus subtilis* (RK-483), *Staphylococcus aureus* (RK-484), *Salmonella enteritidis* (RK-485), *Bacillus cereus* ve *Enterococcus faecalis* (RK-487)) karşı inhibitör etki açısından test edilmiştir. *E. faecium B. cereus* dışında tüm patojenlere ve özellikle *P. aeruginosa, B. subtilis* ve *S. enteritidis*'e karşı iyi bir inhibisyon bölgesi oluşturmuştur. Çalışmamıza benzer olarak pastırmadan izole edilen *E. faecium* suşu *L. monocytogenes, B cereus* ve *S aureus* gibi önemli gıda kaynaklı patojen bakterilere karşı inhibisyon göstermiştir (Dinçer and Kıvanç 2021). Sonuçlarımızdan farklı olarak Ahmadova *et al.* (2013), Azerbaycan Motal peynirinden izole ettikleri *E. faecium* AQ71'in *L. monocytogenes* ve *B. cereus*'un büyümesini inhibe ettiğini, *Salmonella* ve *E. coli* suşlarına karşı hiçbir aktivite göstermediğini rapor etmişlerdir. *L. lactis* suşu *B. subtilis* RK-483'e karşı iyi, *S. aureus* RK-484'e karşı zayıf bir zon çapı oluştururken, *P. aeruginosa* RK-481, *S. enteritidis* RK-485, *Bacillus cereus* ve *Enterococcus faecalis* RK-487'e karşı zon oluşturmamıştır. Sonuçlarımızdan farklı olarak yapılan in vitro çalışmalar *L. lactis*'in, *E. coli, S. aureus, P. aeruginosa, S. typhimurium* ve *E. faecalis*' karşı güçlü bir antibakteriyel etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Gutiérrez *et al.* 2016; Akbar *et al.* 2019; Soundharrajan *et al.* 2021). *L. casei* suşu *B. cereus* dışındaki tüm patojenlere karşı zayıf bir zon bölgesi oluşturmuştur. Divyashree *et al.* (2021) yaptıkları çalışmada *L. casei* MYSRD 108 ve *L. plantarum* MYSRD 71'in *E. coli* (ATCC 25,922), *K. pneumoniae* (MTCC 7407), *P. aeruginosa* (ATCC 15,422) ve *S. aureus*'a (ACTT 6538) karşı antibakteriyel aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir. Suşlarımızın bu çalışmada kullanılan patojenlere karşı genel olarak inhibisyon etkileri olduğu gözlemlenmiştir. *E. faecalis* diğer iki suşa göre test edilen patojenlere karşı daha iyi bir antagonistik etki gösterdiği belirlenmiştir.

Bakteriyosinler çeşitli bakteri türleri tarafından üretilen ve diğer mikroorganizmalar üzerinde inhibe edici veya öldürücü etki gösteren peptitlerdir. Bakteriyosinler farklı etki mekanizmalarına sahiptirler ve hücre lizisine neden olarak veya olmaksızın bakterisit etki gösterenler ve hücre çoğalmasını önleyerek bakteriyostatik etki gösterenler olarak ikiye ayrılabilirler (da Silva Sabo *et al.* 2014). Laktik asit bakterilerinin ürettiği bakteriyosinlerin çoğu, özellikle Gram-pozitif bakterileri inhibe edenler, antibakteriyel etkilerini hücre zarfı ile ilgili mekanizmaları hedefleyerek ortaya koyarlar (Cotter *et al.* 2013). Laktik asit bakterilerinin bakteriyosinleri çoğunlukla çeşitli pH değerlerinde aktiftir, yüksek sıcaklıklara dayanıklıdır ve gıdalardaki çeşitli patojen ve bozulmaya neden olan bakterilere karşı etkilidir (Ahmad *et al.*

2017). Ayrıca, bu bakteriyosinler pankreatin kompleksi, tripsin ve kimotripsin gibi sindirimle ilgili proteazlara karşı hassastır ve bu nedenle bağırsak mikroflorasını olumsuz etkilemez (Egan *et al.* 2016). Çalışmamızda kullanılan üç suştan *L. casei*'nin *S. enteritidis* (RK-485), *B. cereus* ve *E. faecalis* (RK-487)'e karşı güçlü bir inhibitör etki gösterdiği halde *E. faecium*'un süpernatantı uygulama yapılan patojenlere karşı zon oluşturmamıştır. *L. lactis* suşunun süpernatantı ise *P. aeruginosa* (RK-481) ve *B. subtilis* (RK-483)'e karşı zayıf bir zon oluşturmuştur. Yang *et al.* (2021), *E. faecium* CJNU 2524'ün anti-listerial aktiviteye sahip bir bakteriyosin ürettiğini doğrulamıştır. Bakteriyosinin, *L. monocytogenes*'e karşı bakterisidal bir etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Diğer bir çalışmada, *E. faecium* FAIR-E 198'in *B. cereus, L. monocytogenes* ve *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivitesi araştırılmış ve *E. faecium* FAIR-E 198 tarafından üretilen bakteriyosin, değerlendirilen tüm *L. monocytogenes* suşlarını inhibe ettiği ancak araştırılan *B. cereus* ve *S. aureus* suşlarının hiçbirini inhibe etmediği bildirilmiştir (Nascimento *et al.* 2010). Layus *et al.* (2020) de yaptıkları bir çalışmada, *L. plantarum* CRL 759 ve süpernatanın *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'yı inhibe ettiğini göstermiştir. Ramos *et al.* (2015), *L. plantarum* F-10 tarafından üretilen süpernatanın *S. aureus* ve *P. aeruginosa* inhibe ettiğini, biyofilm oluşumlarını azalttığını göstermiş ve enfeksiyonlara karşı bir biyokontrol stratejisi olarak önerilebileceğini bildirmiştir. Sari *et al.* (2018), *L. brevis, L. casei* ve *L. plantarum*' dan elde ettikleri bakteriyosinlerin *B. cereus*'a *B. subtilis*'e ve *S. epidermidis*'e karşı inhibisyon oluşturduklarını bildirmişlerdir. Elde ettiğimiz sonuçlar mevcut çalışmaların bir kısmı ile ilişkilidir (Sari *et al.* 2018). Bazı çalışmalarla uygulama farklılıklarından dolayı benzerlik bulunmamıştır.(Nascimento *et al.* 2010; Ramos *et al.* 2015).

Oto-agregasyon ve ko-agregasyon, probiyotik bakterilerin birbirine ve bağırsak yüzeylerine bağlanma, biyofilm oluşumunu önleme ve patojenlere karşı ilk savunma hattı olarak görev yapabilen kümeler oluşturma yetenekleriyle ilgili iki özelliğidir (Vassos *et al.* 2009; Braïek *et al.* 2018; Nwoko and Okeke 2021). Probiyotik suşların otoagregasyonu, bağırsak epitel hücrelerine yapışma için gereklidir ve koagregasyon yetenekleri, patojenik mikroorganizmaların kolonizasyonunu önleyen bir bariyer oluşturabilmektedir. Çalışmamızda, *E. faecium*'un oto-agregasyon yüzdesi 2 ve 5 saatlik inkübasyondan sonra sırasıyla % 95,83 ve % 97 olarak, *E.coli* ile ko-agregasyon yüzdesi ise % 19,17 olarak belirlenmiş ve süre ile orantılı olarak otoagregasyonda artış gözlemlenmiştir. Zommiti *et al.* (2018), Tunus etinden izole ettikleri *E. faecium* MZF1-4' ün oto-agregasyon yüzdesini 24 saatlik inkübasyondan sonra %50-96 olarak, Vadassery and Pillai (2020) ise *Oreochromis niloticus*'un gastrointestinal kanalından izole ettikleri *E. faecium* QQ12'nin oto-agregasyon yüzdesini %72,91 olarak belirlemişlerdir. Ayrıca *E. faecium* QQ12 *A. hydrophila* ile % 50,6 oranında bir koagregasyon göstermiştir. Tilwani *et al.* (2022) *Cyprinus carpio* bağırsağından izole ettikleri *E. faecium* MC-5'in oto-

agregasyon yüzdesini 6 saatlik inkübasyondan sonra %100 olarak belirlemiş ve suşun 6 saatlik inkübasyondan sonra *Listeria monocytogenes* ile %100 ko-agregasyon gösterdiğini bildirmişlerdir. *E. faecium* suşu, Zommiti *et al.* (2018) ve Vadassery and Pillai (2020) tarafından bildirilen sonuçlarla karşılaştırıldığında daha yüksek bir otoagregasyon ve koagregasyon gösterirken, Tilwani *et al.* (2022) tarafından yapılan çalışmalarla benzer sonuçlar göstermiştir.

*L. lactis'*in 2 ve 5 saatlik inkübasyon sonrası oto-agregasyon yüzdesi sırasıyla % 36,95 ve % 39,13 olarak, *E. coli* ile ko-agregasyon yüzdesi ise % 16,3 olarak belirlenmiştir. Süre ile orantılı olarak oto-agregasyonda bir artış gözlemlenmiştir. Çalışamamıza benzer olarak Mar 2 geni içeren rekombinant *L. lactis* NZ1330 suşu % 37 oranında oto-agregasyon ve *E. coli* ile ko-agregasyon göstermiştir (Vasiee *et al.* 2019). *L. lactis* LL16 ve LL76 suşları 1 saatlik inkübasyon sonrası sırasıyla %76 ve %55 oranında oto-agregasyon (Kondrotiene *et al.* 2020), *L. lactis* T18 suşu ise %79 otoagregasyon ve *E. coli* ile % 21,1 oranında koagregasyon sergilemiştir (Kiani *et al.* 2021). *L. lactis* NZ1330, suşumuz *L. lactis*'e benzer bir oto-agregasyon sergilerken *L. lactis* LL16, LL76 ve T18 izolatları daha yüksek bir oto-agregasyon özelliği göstermiştir.

L. casei ise 2 ve 5 saatlik inkübasyon sonrası sırasıyla % 81,42 ve % 57,14 oranında oto-agregasyon ve % 21,2 oranında ko-agregasyon yüzdesi sergilemiştir. Benzer olarak *L. casei* SJRP166 suşu % 93,88 oranında bir otoagregasyon göstermiştir. Suş ayrıca *L. helveticus* SJRP191, *L. innocua* ATCC 33090*, L. monocytogenes* ATCC 15313'e karşı sırasıyla 74,55, 51,16 ve 66,35 oranlarında coagregasyon sergilemiştir (de Souza *et al.* 2019).

Her üç suş (*E. faecium, L. casei* ve *L. lactis*) otoagregasyon yüzdeleri açısından kendi aralarında karşılaştırıldıklarında en yüksek oran *E. faecium* ve *L. casei'*de belirlenmiş ve *L. lactis* bu suçlara oranla daha düşük bir otoagregasyon özelliği göstermiştir. Suşlar ko-agregasyon özellikleri bakmından karşılaştırıldıklarında ise en iyi oran *E. faecium*'da görülmüş ve bunu sırasıyla *L. lactis* ve *L. casei* takip etmiştir.

Simüle GİS koşullarında invitro toleransları denenen üç bakteri suşu pH 3-8 ortam koşullarında başlangıç ve 3. saat sonunda *E. faecium* sırasıyla %82 ve %72 oranlarında bir canlılık göstermiştir. *L. lactis* ve *L casei* ise başlangıç saatinde sırasıyla %66-%38 canlı kalırken 3 saat sonra canlılık oranı %55-34 olarak ölçülmüştür. *L.casei* diğer iki bakteriye kıyasla daha düşük canlılık oranına sahiptir. Benzer şekilde *L. casei* SJRP38, SJRP135, SJRP144, SJRP148, SJRP150 ve SJRP166 suşlarının inkübasyonun sonuna doğru canlılıklarının azaldığı gözlemlenmiştir (de Souza *et al.* 2019). Nascimento LCS (2015), yaptığı çalışmada *E. faecium* SJRP20 ve SJRP65 suşlarının başlangıç canlılıklarına oranla inkübasyonun sonunda canlılığın azaldığını tesbit etmişlerdir. pH 8'de 4 saat inkübasyona tabi tutulduğunda en yüksek sanlılık

oranı (%9) *L. lactis* suşunda belirlenmiştir. Suşlarımız simüle edilmiş GIT durum analizine maruz kaldıklarında düşük ve yüksek pH'da 240 dakikaya kadar hayatta kalmışlardır. Elde edilen sonuçlar suşların probiyotik olabilme özelliklerini destekler niteliktedir.

Bir anti-besin olan fitat, temel mineralleri şelatlayarak insan vücudunda emilim için daha az kullanılabilir hale getirir. Fitaz üreten probiyotikler, minerallerin biyoyararlanımını artırarak ve insanlarda mineral eksikliğiyle mücadele ederek fitatı bozabilir. Fitaz enzimi üretme yeteneği, fitatın parçalanmasına izin verdiği, fosfat biyoyararlanımını iyileştirdiği ve genel probiyotik işlevselliğine katkıda bulunduğu için probiyotiklerde aranan bir özelliktir (Priyodip *et al.* 2017). Bu nedenle mevcut çalışmada suşların fitaz enzimini üretebilme yetenekleri belirlenmiş ve üç suşunda fitaz üretebildiği belirlenmiştir. En yüksek fitaz aktivitesini *L. lactis* suşu (328 U/mL) göstermiştir. Elde edilen sonuçlara benzer olarak LAB fitaz üretimiyle ilgili bir çok çalışma bulunmaktadır (Anastasio *et al.* 2010; Demir *et al.* 2017; Demir *et al.* 2018; Karagöz *et al.* 2021, Dikbaş *et al.* 2023a,b).

Sonuç olarak, yapılan tüm çalışmalar dikkate alındığında her bir suşun kendine özgü olarak farklı üstün yeteneklere sahip olduğu görülmektedir. Her üç suşta Probiyotik özellik bakımından daha ileri uygulamalar için umut vadetmektedir.

Probiyotik tüketim seviyesinin artması için öncelikle probiyotiklerle ilgili bilgi düzeyinin ve üretilen bakterilerin güvenlik sevyelerinin bilinmesi ve bakterilerin bu özellikleri taşıması gerekmektedir. Probiyotiklerin sağlık sorunlarına fayda sağlamasının yanısıra sektördeki (yiyecek ve içecek endüstrisi, tarım ve hayvan yemi, ilaç endüstrisi, çevresel uygulamalar, endüstriyel fermantasyon) öneminden dolayı bakterilerin taranmasına yönelik çalışmalar yapılmalıdır. Yapılan bu tezle literatüre yeni ve güçlü probiyotik özellikli bakteriler sunulmuştur. Bu çalışmada izolatların probiyotik amaçlı kültür olarak kullanılmasına yönelik ilk adım atılmıştır.

Gelecekte bu bakterilerin; sinerjik etkilerinin, insan sağlığına yönelik klinik çalışmalarının, teknolojik özelliklerinin (gerilme stabilitesi, ürünlerde canlılık, bakteriyofaj, rezistans) ve toksikoloji testlerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların yapılması faydalı olacaktır.

KAYNAKÇA

Abiad, M. G., Ajjour, C., Kassaify, Z., Iskandar, C. F., Hamzeh, R., Hassan, H. F., 2022. Preliminary physiological, phenotypic, and probiotic characterization of *Lactobacillus* strains isolated from Anbaris-traditional Lebanese fermented dairy product. International Journal of Food Properties, 25(1), 1266-1278.

Ahmad, V., Khan, M.S., Jamal, Q.M.S., Alzohairy, M.A., Al Karaawi, M.A., Siddiqui, M.U., 2017. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. International Journal of Antimicrobial Agents, 49, 1-11.

Ahmadova, A., Todorov, S. D., Choiset, Y., Rabesona, H., Zadi, T. M., Kuliyev, A., ... & Haertlé, T., 2013. Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. Food Control, 30(2), 631-641.

Akbar, A., Sadiq, M. B., Ali, I., Anwar, M., Muhammad, N., Muhammad, J., ... & Anal, A. K., 2019. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from fermented milk products and its antimicrobial potential. CyTA-Journal of Food, 17(1), 214-220.

Alameri, F., Tarique, M., Osaili, T., Obaid, R., Abdalla, A., Masad, R., ... & Ayyash, M., 2022. Lactic acid bacteria isolated from fresh vegetable products: potential probiotic and postbiotic characteristics including immunomodulatory effects. Microorganisms, 10(2), 389.

Al-Harthi, M. A., Attia, Y. A., El-Shafey, A. S., & Elgandy, M. F., 2020. Impact of phytase on improving the utilisation of pelleted broiler diets containing olive by-products. Italian Journal of Animal Science, 19(1), 310-318.

Ali, S. A., 2021. Efficacy Of Supplementatıon Of Phytase Enzyme To Broıler Dıets Wıth Or Wıthout Dı-Calcıum Phosphate On Performance And Economıc Appraısal. Egyptian Poultry Science Journal, 41(2), 317-331.

Aljaloud, S., Colleran, H. L., & Ibrahim, S. A., 2020. Nutritional value of date fruits and potential use in nutritional bars for athletes. Food and Nutrition Sciences, 11(06), 463.

Anastasio, M., Pepe, O., Cirillo, T., Palomba, S., Blaiotta, G., & Villani, F., 2010. Selection and use of phytate-degrading LAB to improve cereal-based products by mineral solubilization during dough fermentation. Journal of Food Science, 75(1), M28-M35.

Anonim, 2023. https://www.statista.com/statistics/821259/global-probioticsl-market-value/ (17.07.2023).

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.

Ashraf, M., 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. Biotechnology advances, 27(1), 84-93.

Ayivi, R. D., Gyawali, R., Krastanov, A., Aljaloud, S. O., Worku, M., Tahergorabi, R., ... & Ibrahim, S. A., 2020. Lactic acid bacteria: Food safety and human health applications. Dairy, 1(3), 202-232.

Ayyash, M. M., Abdalla, A. K., AlKalbani, N. S., Baig, M. A., Turner, M. S., Liu, S. Q., & Shah, N. P., 2021. Invited review: Characterization of new probiotics from dairy and nondairy products—Insights into acid tolerance, bile metabolism and tolerance, and adhesion capability. Journal of Dairy Science, 104(8), 8363-8379.

Baloch, F. N., Baloch, H. N., Khan, A. U., Baloch, N. M., Baloch, I. A., Baloch, N. K., ... & Samejo, A. K., 2021. Effect of phytase enzyme on organs growth performance and blood profile of broiler. Advances in Enzyme Research, 9(3), 37-49.

Banerjee, G., Nandi, A., Ray, A. K., 2017. Assessment of hemolytic activity, enzyme production and bacteriocin characterization of *Bacillus subtilis* LR1 isolated from the gastrointestinal tract of fish. Archives of Microbiology, 199: 115–124.

Bhagat, D., Slathia, P. S., Raina, N., Sharma, P., 2019. Production of phytase from *Lactobacillus paracasei* strain and its probiotic profile.

Braïek, O. B., Morandi, S., Cremonesi, P., Smaoui, S., Hani, K., & Ghrairi, T., 2018. Biotechnological potential, probiotic and safety properties of newly isolated enterocin-producing *Enterococcus lactis* strains. LWT, 92, 361-370.

Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N., 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. Critical reviews in microbiology, 28(4), 281-370.

Collado, M. C., Isolauri, E., Laitinen, K., Salminen, S., 2008. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. The American journal of clinical nutrition, 88(4), 894-899.

Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C., 2013. Bacteriocins-a viable alternative to antibiotics? Nature Reviews Microbiology, 11, 95-105.

da Silva Sabo, S., Vitolo, M., González, J.M.D., De Souza Oliveira, R.P., 2014. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. Food Research International, 64, 527-536.

Dahiya, D. and Nigam, P. S., 2020. Waste management by biological approach employing natural substrates and microbial agents for the remediation of dyes' wastewater. Applied Sciences, 10(8), 2958.

de Souza, B. M. S., Borgonovi, T. F., Casarotti, S. N., Todorov, S. D., & Penna, A. L. B., 2019. *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus fermentum* strains isolated from mozzarella cheese: probiotic potential, safety, acidifying kinetic parameters and viability under gastrointestinal tract conditions. Probiotics and antimicrobial proteins, 11, 382-396.

de Souza, E. L., de Albuquerque, T. M. R., Dos Santos, A. S., Massa, N. M. L., & de Brito Alves, J. L., 2019. Potential interactions among phenolic compounds and probiotics for mutual boosting of their health-promoting properties and food functionalities–A review. Critical reviews in food science and nutrition, 59(10), 1645-1659.

Demir, Y., Dikbaş, N., Beydemir, Ş., 2018. Purification and biochemical characterization of phytase enzyme from *Lactobacillus coryniformis* (MH121153). Mol Biotechno l60(11):783-790.

Demir, Y., Şenol Kotan, M., Dikbaş, N., Beydemir, Ş., 2017. Phytase from *Weissella halotolerans*: purification, partial characterisation and the effect of some metals. Int J Food Prop,20(2), 2127-2137.

Denkova, R., Goranov, B., Teneva, D., Denkova, Z., & Kostov, G., 2017. Antimicrobial activity of probiotic microorganisms: Mechanisms of interaction and methods of examination. Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs, 1, 201-212.

Dikbaş, N., Parlakova Karagöz, F., Uçar, S., Demir, Y., 2023a. *Ornamental cabbage* (*Brassica oleracea* var. acephala) responses to phytase enzyme purified from *Lactobacillus coryniformis* application. Biotechnology and Applied Biochemistry.

Dikbaş, N., Uçar, S., Alım, Ş., 2023b. Purification of phytase enzyme from *Lactobacillus brevis* and biochemical properties. Biologia, 1-9.

Dinçer, E. and Kıvanç, M., 2021. In vitro evaluation of probiotic potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from Turkish pastırma. Archives of Microbiology, 203(6), 2831-2841.

Divyashree, S., Anjali, P. G., Somashekaraiah, R., Sreenivasa, M. Y., 2021. Probiotic properties of *Lactobacillus casei*–MYSRD 108 and *Lactobacillus plantarum*-MYSRD 71 with potential antimicrobial activity against *Salmonella paratyphi*. Biotechnology Reports, 32, e00672.

Dixit, G., Samarth, D., Tale, V., & Bhadekar, R., 2013. Comparative studies on potential probiotic characteristics of *Lactobacillus acidophilus* strains. EurAsian Journal of BioSciences, 7.

Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Collins, J. K., 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. The American journal of clinical nutrition, 73(2), 386-392.

Egan, K., Field, D., Rea, M.C., Ross, R.P., Hill, C., Cotter, P.D., 2016. Bacteriocins: novel solutions to age old spore-related problems? Frontiers in Microbiology, 7, 461.

Erkmen, O., 2021. Microbiological analysis of foods and food processing environments. Academic Press.

Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. The Journal of applied bacteriology, 66(5), 365-378.

García-Fruitós, E., 2012. Lactic acid bacteria: a promising alternative for recombinant protein production. Microbial cell factories, 11(1), 157.

Giraffa, G., 2003. Functionality of enterococci in dairy products. International journal of food microbiology, 88(2-3), 215-222.

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

Gu, Q., & Li, P., 2016. Biosynthesis of vitamins by probiotic bacteria. Probiotics and prebiotics in human nutrition and health, 135-48.

Gu, Q., Zhang, C., Song, D., Li, P., & Zhu, X., 2015. Enhancing vitamin B12 content in soy-yogurt by *Lactobacillus reuteri*. International Journal of Food Microbiology, 206, 56-59.

Gueimonde, M. and Salminen, S. 2006. New methods for selecting and evaluating probiotics. Digestive and Liver Disease, 38, 242-247.

Gutiérrez, S., Martínez-Blanco, H., Rodríguez-Aparicio, L. B., & Ferrero, M. A., 2016. Effect of fermented broth from lactic acid bacteria on pathogenic bacteria proliferation. Journal of Dairy Science, 99(4), 2654-2665.

Hadef, S., Idoui, T., Sifour, M., Genay, M., & Dary-Mourot, A., 2023. Screening of wild lactic acid bacteria from algerian traditional cheeses and goat butter to develop a new probiotic starter culture. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 15(2), 387-399.

Hamon, E., Horvatovich, P., Bisch, M., Bringel, F., Marchioni, E., Aoudé-Werner, D., & Ennahar, S., 2012. Investigation of biomarkers of bile tolerance in *Lactobacillus casei* using comparative proteomics. Journal of proteome research, 11(1), 109-118.

Hassan, M. U., Nayab, H., Shafique, F., Williamson, M. P., Almansouri, T. S., Asim, N., ... & Akbar, N., 2020. Probiotic properties of Lactobacillus helveticus and Lactobacillus plantarum isolated from traditional Pakistani Yoghurt. BioMed research international, 2020.

Hernández, T., Sánchez, I., López, N., Prieto, L., Hernández, A., & Arenal, A., 2023. Antibiotic resistance *Lactobacillus* spp. from human breast milk: can be an option as probiotics?.

Hosseini, S. V., Arlindo, S., Böhme, K., Fernández-No, C., Calo-Mata, P., & Barros-Velázquez, J., 2009. Molecular and probiotic characterization of bacteriocin-producing Enterococcus faecium strains isolated from nonfermented animal foods. Journal of applied microbiology, 107(4), 1392-1403.

Hugas, M., Garriga, M., & Aymerich, M. T., 2003. Functionalty of enterococci in meat products. International journal of food microbiology, 88(2-3), 223-233.

Hyronimus, B., Le Marrec, C., Sassi, A. H., Deschamps, A. 2000. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. International journal of food microbiology, 61(2-3), 193-197.

Jawan, R., Abbasiliasi, S., Mustafa, S., Kapri, M. R., Halim, M., & Ariff, A. B., 2021. In vitro evaluation of potential probiotic strain *Lactococcus lactis* Gh1 and its bacteriocin-like inhibitory substances for potential use in the food industry. Probiotics and antimicrobial proteins, 13, 422-440.

Karagöz, F. P., Demir, Y., Kotan, M. Ş., Dursun, A., Beydemir, Ş., & Dikbaş, N., 2021. Purification of the phytase enzyme from *Lactobacillus plantarum*: The effect on pansy growth and macro–micro element content. Biotechnology and Applied Biochemistry, 68(5), 1067-1075.

Khalid, K., 2011. An overview of lactic acid bacteria. Int. J. Biosci, 1(3), 1-13.

Khodaii, Z., Mehrabani Natanzi, M., Naseri, M. H., Goudarzvand, M., Dodson, H., Snelling, A. M., 2013. Phytase activity of lactic acid bacteria isolated from dairy and pharmaceutical probiotic products. Int J Enteric Pathog, 1(1), 12-16.

Kılıç, N. K., Dönmez, G., 2013. Phenol biodegradation by different mixed cultures and the optimization of efficiency of the degradation. Environmental technology, 34(15), 2251-2258.

Kiani, A., Nami, Y., Hedayati, S., Jaymand, M., Samadian, H., & Haghshenas, B., 2021. Tarkhineh as a new microencapsulation matrix improves the quality and sensory characteristics of probiotic *Lactococcus lactis* KUMS-T18 enriched potato chips. Scientific Reports, 11(1), 12599.

Kim, J. A., Bayo, J., Cha, J., Choi, Y. J., Jung, M. Y., Kim, D. H., & Kim, Y., 2019. Investigating the probiotic characteristics of four microbial strains with potential application in feed industry. PloS one, 14(6), e0218922.

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, 419–431.

Koçak, Y., & Çiftci, A., 2020. Tavuk kökenli *Enterococcus faecium* ve *Lactobacillus* türlerinin probiyotik özelliklerinin araştırılması. Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences, 5(3), 356-365.

Kondrotiene, K., Lauciene, L., Andruleviciute, V., Kasetiene, N., Serniene, L., Sekmokiene, D., & Malakauskas, M., 2020. Safety assessment and preliminary in vitro evaluation of probiotic potential of *Lactococcus lactis* strains naturally present in raw and fermented milk. Current microbiology, 77, 3013-3023.

Kumar Bajaj, B., Andrabi, T., JJ Claes, I., & Lebeer, S., 2014. Bioprospecting for functionally-proficient potential probiotics. Current Nutrition & Food Science, 10(4), 251-263.

Layus, B. I., Gerez, C. L., & Rodriguez, A. V., 2020. Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* CRL 759 against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Arabian Journal for Science and Engineering, 45, 4503-4510.

Lee C.H., Steiner T., Petrof E.O., Smieja M., Roscoe D., Nematallah A., Weese J.S., Collins S., Moayyedi P., Crowther M., Ropelesk M.J., Jayaratne P., Higgins D., Li Y., Rau N.V., Kim P.T., 2016. Frozen vs fresh fecal microbiota transplantation and clinical resolution of diarrhea in patients with recurrent *Clostridium difficile* ınfection a randomized clinical trial. American Medical Association, 315 (2),142- 149.

Lee, Y. K. and Salminen, S., 2009. Handbook of probiotics and prebiotics. John Wiley & Sons.

Lilly, D. M. and Stillwell, R. H., 1965. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. Science, 147(3659), 747-748.

Liong, M. T. and Shah, N. P., 2005. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. Journal of dairy science, 88(1), 55-66.

Lourens-Hattingh, A. and Viljoen, B. C., 2001. Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. Food Research International, 34(9), 791-796.

Mansour, N. M., Heine, H., Abdou, S. M., Shenana, M. E., Zakaria, M. K., & El-Diwany, A., 2014. Isolation of *Enterococcus faecium* NM113, *Enterococcus faecium* NM213 and *Lactobacillus casei* NM512 as novel probiotics with immunomodulatory properties. Microbiology and immunology, 58(10), 559-569.

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.

Markowiak, P., & Śliżewska, K., 2017. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. Nutrients, 9(9), 1021.

Mathur, H., Beresford, T. P., & Cotter, P. D., 2020. Health benefits of lactic acid bacteria (LAB) fermentates. Nutrients, 12(6), 1679.

Menrad, K., 2003. Market and marketing of functional food in Europe. Journal of food engineering, 56(2-3), 181-188.

Mora-Villalobos, J. A., Montero-Zamora, J., Barboza, N., Rojas-Garbanzo, C., Usaga, J., Redondo-Solano, M., ... & López-Gómez, J. P., 2020. Multi-product lactic acid bacteria fermentations: A review. Fermentation, 6(1), 23.

Moreno, M. F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., & De Vuyst, L., 2006. The role and application of enterococci in food and health. International journal of food microbiology, 106(1), 1-24.

Mortezaei, F., Royan, M., Allaf Noveirian, H., Babakhani, A., Alaie Kordghashlaghi, H., & Balcázar, J. L., 2020. In vitro assessment of potential probiotic characteristics of indigenous *Lactococcus lactis* and *Weissella oryzae* isolates from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Journal of applied microbiology, 129(4), 1004-1019.

Nageshwar, L., Parameshwar, J., Rahman, P. K., Banat, I. M., & Hameeda, B., 2022. Anti-oxidative property of xylolipid produced by *Lactococcus lactis* LNH70 and its potential use as fruit juice preservative. Brazilian Journal of Microbiology, 53(4), 2157-2172.

Nami, Y., Vaseghi Bakhshayesh, R., Mohammadzadeh Jalaly, H., Lotfi, H., Eslami, S., & Hejazi, M. A., 2019. Probiotic properties of *Enterococcus* isolated from artisanal dairy products. Frontiers in microbiology, 10, 300.

Nascimento, L.C.S., 2015. Probiótico e Substância de Produção culturas antimicrobianas potenciais para o ácido láctico e Aplicação em Leite Fermentado. Ph D. Thesis, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista

Nascimento, M. D. S. D., Moreno, I., & Kuaye, A. Y., 2010. Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 against gram-positive pathogens. Brazilian Journal of Microbiology, 41, 74-81.

Nath, S., Sikidar, J., Roy, M., & Deb, B., 2020. In vitro screening of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented milk product. Food Quality and Safety, 4(4), 213-223

Nwoko, E. S. Q. and Okeke, I. N., 2021. Bacteria autoaggregation: how and why bacteria stick together. Biochemical Society Transactions, 49(3), 1147-1157.

Ouwehand, A. C., Forssten, S., Hibberd, A. A., Lyra, A., Stahl, B., 2016. Probiotic approach to prevent antibiotic resistance. Annals of Medicine, 48(4), 246-255.

Palukuri, M. V., Shivakumar, S., Sahoo, S., & Rengaswamy, R., 2018. Computational framework for exploring the interplay of diet and gut microbiota in autism. bioRxiv, 42293 .

Pandey, K. R., Naik, S. R., & Vakil, B. V., 2015. Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. Journal of food science and technology, 52, 7577-7587.

Papamanoli, E., Tzatanetakis, N., Litopoulou Tzanetaki, E., Kotzekidou, P., 2003. Characterisation of LAB isolated from Greek dry fermented sausages in respect of their technological and probiotic properties. Meat Science, 652, 859–867.

Patki, J. M., Singh, S., Mehta, S., 2015. Partial purification and characterization of phytase from bacteria inhabiting the mangroves of the western coast of India. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, 4(9), 156-169.

Poolman, B., Juillard, V., Kunji, E.R.S., Hagting, A., Konings, W.N., 1996. Casein-breakdown by *Lactococcus lactis*. In: Faruk Bozoğlu, T., Ray, B. (eds) Lactic Acid Bacteria. NATO ASI Series, vol 98. Springer, Berlin, Heidelberg.

Pradhan, P. and Tamang, J. P., 2021. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally prepared dry starters of the Eastern Himalayas. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 37, 1-13.

Priyodip, P., Prakash, P. Y., & Balaji, S., 2017. Phytases of probiotic bacteria: characteristics and beneficial aspects. Indian Journal of Microbiology, 57, 148-154.

Rajput, K., Dubey, R. C., & Kumar, A., 2022. Probiotic potential and immunomodulatory properties in *Enterococcus faecium* GMB24 and *Enterococcus hirae* SMB16 isolated from goat and sheep milk. Archives of Microbiology, 204(10), 619.

Ramos, A.N., Sesto Cabral, M.E., Arena, M.E., Arrighi, C.F., 2015. Compounds from *Lactobacillus plantarum* culture supernatants with potential pro-healing and anti-pathogenic properties in skin chronic wounds. Pharm. Biol. 53, 350–358.

Rasika, D. M., Vidanarachchi, J. K., Rocha, R. S., Balthazar, C. F., Cruz, A. G., Sant'Ana, A. S., & Ranadheera, C. S., 2021. Plant-based milk substitutes as emerging probiotic carriers. Current Opinion in Food Science, 38, 8-20.

Reuben, R. C., Roy, P. C., Sarkar, S. L., Alam, A. R. U., & Jahid, I. K., 2020. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties. Journal of dairy science, 103(2), 1223-1237.

Riane, K., Sifour, M., Ouled-Haddar, H., Idoui, T., Bounar, S., & Boussebt, S., 2021. Probiotic properties and antioxidant efficiency of *Lactobacillus plantarum* 15 isolated from milk. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 2021, 516-520.

Rivera-Espinoza, Y. and Gallardo-Navarro, Y., 2010. Non-dairy probiotic products. Food microbiology, 27(1), 1-11.

Rönkä, E., Malinen, E., Saarela, M., Rinta-Koski, M., Aarnikunnas, J., & Palva, A., 2003. Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. International journal of food microbiology, 83(1), 63-74.

Rubio, R., Jofré, A., Martín, B., Aymerich, T., & Garriga, M., 2014. Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. Food microbiology, 38, 303-311.

Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Benito, M. J., Nevado, F. P., & de Guía Córdoba, M., 2008. Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. Meat Science, 80(3), 715-721.

Saarela, M., Alakomi, H. L., Mättö, J., Ahonen, A. M., Puhakka, A., & Tynkkynen, S., 2011. Improving the storage stability of Bifidobacterium breve in low pH fruit juice. International journal of food microbiology, 149(1), 106-110.

Sai Priya, T. and Sarathchandra, G., 2022. The realm of probiotics: An overview. The Pharma Innovation Journal, 11(4), 2072-2080.

Salminen, S. and von Wright, A., 1998. Current probiotics-safety assured?. Microbial ecology in Health and Disease, 10(2), 68-77.

Salvetti, E., Orrù, L., Capozzi, V., Martina, A., Lamontanara, A., Keller, D., ... & Spano, G., 2016. Integrate genome-based assessment of safety for probiotic strains: *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 as a case study. Applied microbiology and biotechnology, 100, 4595-4605.

Salvetti, E., Torriani, S., & Felis, G. E., 2012. The genus Lactobacillus: a taxonomic update. Probiotics and antimicrobial proteins, 4, 217-226.

Sandez Penidez, S. H., Velasco Manini, M. A., Gerez, C. L., & Rollán, G. C., 2020. Partial characterization and purification of phytase from *Lactobacillus plantarum* CRL1964 isolated from pseudocereals. Journal of Basic Microbiology, 60(9), 787-798.

Sarıbuğa, E., 2013. *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus acidophilus* bakterilerinden fitaz enziminin kısmen saflaştırılması ve bazı kinetik özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum

Sari, N. P., Sari, R., & Untari, E. K., 2018. Antibacterial activity test of bacteriocin from *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* against Gram Positive pathogenic bacteria. Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology, 3(3), 85-91.

Scharfen, E. C., Mills, D. A., & Maga, E. A., 2007. Use of human lysozyme transgenic goat milk in cheese making: effects on lactic acid bacteria performance. Journal of Dairy Science, 90(9), 4084-4091.

Senjaliya, D. P. and Georrge, J. J., 2023. Functional Characterization of *Lactobacillus plantarum* isolated from cow milk and the development of fermented coconut and carrot juice mixed beverage. Current Microbiology, 80(5), 139.

Siddique, A., Azim, S., Ali, A., Adnan, F., Arif, M., Imran, M., ... & Rahman, A., 2021. *Lactobacillus reuteri* and *Enterococcus faecium* from poultry gut reduce mucin

adhesion and biofilm formation of cephalosporin and fluoroquinolone-resistant *Salmonella enterica*. Animals, 11(12), 3435.

Silva de Ruiz, C., Del R. Rey, M., & Nader-Macías, M. E., 2003. Structural and ultrastructural studies of the urinary tract of mice inoculated with *Lactobacillus fermentum*. BJU international, 91(9), 878-882.

Silva, D. R., Sardi, J. D. C. O., de Souza Pitangui, N., Roque, S. M., da Silva, A. C. B., & Rosalen, P. L., 2020. Probiotics as an alternative antimicrobial therapy: Current reality and future directions. Journal of Functional Foods, 73, 104080.

Singhal, N., Maurya, A. K., Mohanty, S., Kumar, M., & Virdi, J. S., 2019. Evaluation of bile salt hydrolases, cholesterol-lowering capabilities, and probiotic potential of *Enterococcus faecium* isolated from rhizosphere. Frontiers in microbiology, 10, 1567.

Soltani, N., Abbasi, S., Baghaeifar, S., Taheri, E., Jadid, M. F. S., Emami, P., ... & Aslanshirzadeh, F., 2022. Antibacterial and antibiofilm activity of *Lactobacillus* strains secretome and extraction against *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection. Biotechnology Reports, 36, e00760.

Somashekaraiah, R., Shruthi, B., Deepthi, B. V., & Sreenivasa, M. Y., 2019. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from neera: a naturally fermenting coconut palm nectar. Frontiers in microbiology, 10, 1382.

Sornsenee, P., Singkhamanan, K., Sangkhathat, S., Saengsuwan, P., & Romyasamit, C., 2021. probiotic properties of *Lactobacillus* species ısolated from fermented palm sap in Thailand. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 1-13.

Soundharrajan, I., Yoon, Y. H., Muthusamy, K., Jung, J. S., Lee, H. J., Han, O. K., & Choi, K. C., 2021. Isolation of *Lactococcus lactis* from whole crop rice and determining its probiotic and antimicrobial properties towards gastrointestinal associated bacteria. Microorganisms, 9(12), 2513.

Stewart, J. M. and Vavrek, R. J., 1986. Bradykinin competitive antagonists for classical kinin systems. In Kinins IV: Part A Proceedings of the Fourth International Kinin Congress, held October 21–25, 1984, in Savannah, Georgia (pp. 537-542). Boston, MA: Springer US.

Sullivan, Å. and Nord, C. E., 2005. Probiotics and gastrointestinal diseases. Journal of internal medicine, 257(1), 78-92.

Şenol Kotan, M., 2020. *Fusarium oxysporum* f.sp. radicis-cucumerinum'a karşi etkili bakteri içerikli biyolojik ürün geliştirilmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Şimşek, Ö., Çon, A. H., & Tulumoğlu, Ş., 2006. Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough processes. Food Control, 17(4), 263-270.

Taheur, F. B., Kouidhi, B., Fdhila, K., Elabed, H., Slama, R. B., Mahdouani, K., ... & Chaieb, K., 2016. Anti-bacterial and anti-biofilm activity of probiotic bacteria against oral pathogens. Microbial pathogenesis, 97, 213-220.

Tilwani, Y. M., Lakra, A. K., Domdi, L., Jha, N., & Arul, V., 2022. Characterization of potential probiotic bacteria *Enterococcus faecium* MC-5 isolated from the gut content of *Cyprinus carpio specularis*. Microbial Pathogenesis, 172, 105783.

Todorov, S. D., Nyati, H., Meincken, M., & Dicks, L. M. T., 2007. Partial characterization of bacteriocin AMA-K, produced by Lactobacillus plantarum AMA-K isolated from naturally fermented milk from Zimbabwe. Food control, 18(6), 656-664.

Tokatlı, M., Gülgör, G., Bağder Elmacı, S., Arslankoz İşleyen, N., & Özçelik, F., 2015. In vitro properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles. BioMed research international.

Turchi, B., Mancini, S., Fratini, F., Pedonese, F., Nuvoloni, R., Bertelloni, F., Cerri, D., 2013. Preliminary evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Italian food products. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 29(10), 1913-1922.

Turgay, Ö. and Erbilir, F., 2006. Isolation and characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from various foods. Turkish Journal of Biology, 30(1), 39-44.

Urdaneta, V. and Casadesús, J., 2017. Interactions between bacteria and bile salts in the gastrointestinal and hepatobiliary tracts. Frontiers in medicine, 4, 163.

Vadassery, D.H., Pillai, D., 2020. Quorum quenching potential of *Enterococcus faecium* QQ12 isolated from gastrointestinal tract of *Oreochromis niloticus* and its application as a probiotic for the control of *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus 1758). Braz J Microbiol 51, 1333–1343.

Vasiee, A., Mortazavi, S. A., Sankian, M., Yazdi, F. T., Mahmoudi, M., & Shahidi, F., 2019. Antagonistic activity of recombinant *Lactococcus lactis* NZ1330 on the adhesion properties of *Escherichia coli* causing urinary tract infection. Microbial Pathogenesis, 133, 103547.

Vassos, D., Bezirtzoglou, E., Voidarou, C., Alexopoulos, A., & Maipa, V., 2009. Biochemical and antimicrobial profile of *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* isolated from traditional dairy products and infant intestinal microbiota. Microbial Ecology in Health and Disease, 21(3-4), 241-250.

Vergin, F. V., 1954. Anti-und probiotika. Hippokrates, 25(4), 16-119.

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.

Wendel, U., 2022. Assessing viability and stress tolerance of probiotics—a review. Frontiers in Microbiology, 12, 4351.

Yadav, R., Puniya, A. K., & Shukla, P., 2016. Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* RYPR1 from an indigenous fermented beverage Raabadi. Frontiers in microbiology, 7, 1683.

Yang, J. M. and Moon, G. S., 2021. Partial characterization of an anti-listerial bacteriocin from *Enterococcus faecium* CJNU 2524. Food Science of Animal Resources, 41(1), 164.

Yerlikaya, O. and Akbulut, N., 2020. In vitro characterisation of probiotic properties of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* strains isolated from raw milk and traditional dairy products. International Journal of Dairy Technology, 73(1), 98-107.

Yerlikaya, O., 2019. Probiotic potential and biochemical and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains isolated from raw milk and kefir grains. Journal of dairy science, 102(1), 124-134.

Yılmaz, M., & Erdem, A. O. (2020). The protective role of probiotics in sepsis-induced rats. Turk. J. Trauma Emerg. Surg, 26, 843-846.

Yoon, K. Y., Woodams, E. E., Hang, Y. D., 2006. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. Bioresource technology, 97(12), 1427-1430.

Zommiti, M., Cambronel, M., Maillot, O., Barreau, M., Sebei, K., Feuilloley, M., ... & Connil, N., 2018. Evaluation of probiotic properties and safety of *Enterococcus faecium* isolated from artisanal Tunisian meat “Dried Ossban”. Frontiers in Microbiology, 9, 1685.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler		
Adı Soyadı	**:**	
Doğum tarihi	**:**	
Doğum Yeri	**:**	
Uyruğu	**:**	
Adres	**:**	
Tel	**:**	
E-mail	**:**	
Eğitim		
Lise	**:**	
Lisans	**:**	
Yüksek lisans	**:**	
Doktora	**:**	
Yabancı Dil Bilgisi		
İngilizce	:	İyi
Almanca	:	- (Yoksa bu satırı siliniz)
Rusça	:	- (Yoksa bu satırı siliniz)
Diğer		- (Yoksa bu satırı siliniz)
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar		
Türk Biyokimya Derneği		
Türk Farmasötik ve Medisinal Kimya Derneği		
Tezden Üretilmiş Yayınlar		
1.AAAAAA, BBBBB dergisi		
2.CCCCCC, DDDDDD dergisi		