



**TURŞU KAYNAKLI LAKTİK ASİT  
BAKTERİLERİNİN BAZI PROBİYOTİK  
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**Nur BAYRAK**

**Yüksek Lisans Tezi  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı  
Prof. Dr. Bülent ÇETİN  
2019  
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TURŞU KAYNAKLI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BAZI  
PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**Nur BAYRAK**

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**ERZURUM  
2019**

**Her hakkı saklıdır**



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

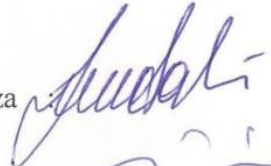
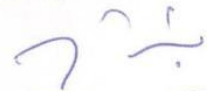
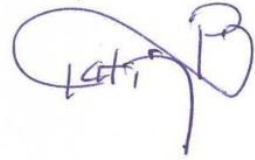


TEZ ONAY FORMU

TURŞU KAYNAKLI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BAZI PROBİYOTİK  
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Prof. Dr. Bülent ÇETİN..... danışmanlığında, ..... N. BAYRAK..... tarafından  
hazırlanan bu çalışma, 29.07/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından  
Çiğdem M. Muhadiligi..... Anabilim Dalı ..... Çiğdem M. Muhadiligi..... Bilim Dalı'nda  
Yüksek Lisans..... tezi olarak oybirliği / oy çokluğu (3./3) ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN  
Üye : Prof. Dr. İhsan Güngör SAT  
Üye : Prof. Dr. Bülent ÇETİN

İmza :   
İmza :   
İmza : 

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun 08.08/2019 tarih ve ...32./54... nolu kararı ile onaylanmıştır.

  
Prof. Dr. Mehmet KARAKAN Y.  
Enstitü Müdürü

**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.

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### **TURŞU KAYNAKLI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BAZI PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Nur BAYRAK

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Bülent ÇETİN

Probiyotikler, yeterli miktarda alındığı zaman konakçı üzerinde sağlığa yararlı etkilere sahip olan canlı mikroorganizmalardır. Günümüzde tüketicilerin sağlıklı beslenme hakkında daha bilinçli hale gelmesi probiyotiklere verilen önemi arttırmıştır. Bu çalışmada turşu kaynaklı laktik asit bakterilerinin bazı probiyotik özelliklerinin incelenmesi ve farklı sıcaklıklarda gelişimlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu maksatla moleküler yöntemlerle tanıları gerçekleştirilmiş 92 LAB suşu mide ortamına direnç ve safra tuzlarına tolerans açısından incelenmiştir. Suşların %32,6'sının mide ve safra bariyerini geçebildiği görülmüştür. Yapılan analizler sonucunda en üstün özelliklere sahip olan *Lactobacillus plantarum* RN107 ve *Lactobacillus plantarum* RN154 suşlarının, insan kolon kanser hücreleri olan HCT-116 ve HT-29 hatlarına tutunum yetenekleri incelenmiştir. Her iki suşta HCT-116 ve HT-29 hücrelerine tutunabilmiştir. Tutunum oranlarının %8,2-%30,4 arasında değiştiği ve RN154 numaralı suşun daha yüksek tutunum kapasitesine sahip olduğu görülmüştür. Sonuç olarak RN107 ve RN154 suşlarının iyi birer probiyotik adayı olabilecekleri tespit edilmiştir.

**2019, 70 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Turşu, probiyotik, hücre kültürü, tutunum yeteneği

## ABSTRACT

MS Thesis

### INVESTIGATION OF SOME PROBIOTIC PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA OBTAINED FROM PICKLE

Nur BAYRAK

Atatürk University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Bülent ÇETİN

Probiotics are living microorganisms that have health beneficial effects on the host when taken in sufficient amounts. Today, consumers become more conscious about healthy nutrition and eating habits have increased the importance given to probiotics. The aim of this study was to investigate some probiotic properties of pickled lactic acid bacteria and to determine their development at different temperatures. For this purpose, 92 LAB strains were examined for their resistance to gastric juice and tolerance to bile salts. It was observed that 32,6% of the strains could cross the stomach and bile barrier. The adhesion ability of *Lactobacillus plantarum* RN107 and *Lactobacillus plantarum* RN154 strains, which have the most superior properties, to the human colon cancer cell lines HCT-116 and HT-29, were examined. Both strains were able to adhere to HCT-116 and HT-29 cells. The adhesion percentage of strains ranged from 8,2 to 30,4 % and RN154 strain has a higher adhesion capacity. As a result, the data suggested that RN107 and RN154 strains are potentially useful candidate probiotics.

**2019, 70 pages**

**Keywords:** Pickle, probiotic, cell culture, adhesion ability

## TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen, çok değerli görüşleri ve eleştirileriyle bana her zaman yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Bülent ÇETİN'e,

Tez çalışmalarına destek veren Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dâhili Tıp Bilimleri Bölümü'nden Sayın Prof. Dr. Elif ÇADIRCI'ya ve Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Bölümü'nden Sayın Doktor Öğretim Üyesi İrfan ÇINAR'a,

Laboratuvar çalışmalarında beni yalnız bırakmayan Gıda Mühendisi Neslihan ARSLAN'a,

Beni bugünlere getirebilmek için her türlü fedakârlığı yapan, hayata karşı daha cesur olmamı sağlayan, sevgilerini hep hissettiğim canım annem Hava BAYRAK, sevgili babam Hüseyin BAYRAK, ömrüme ortak canım abilerim, yengem ve biricik yeğenim Duru Kız'a,

Her türlü sevincimi sıkıntımı paylaştığım, hiçbir konuda benden desteğini esirgemeyen ve beni hep motive eden sevgili eşim Oğuzhan BAYRAK'a, teşekkür ederim.

**Nur BAYRAK**

**Temmuz, 2019**

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                      |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ÖZET.....                                                                                                            | i         |
| ABSTRACT.....                                                                                                        | ii        |
| TEŞEKKÜR.....                                                                                                        | iii       |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....                                                                                 | vi        |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                                                                                 | viii      |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                                                              | ix        |
| <b>1. GİRİŞ.....</b>                                                                                                 | <b>1</b>  |
| 1.1. Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar .....                                                            | 4         |
| 1.1.1. Probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmaların belirlenmesinde<br>başvurulan <i>in vitro</i> testler..... | 9         |
| 1.1.1.a. Probiyotik mikroorganizmaların mide sıvısının asidik koşullarına ve safra<br>tuzlarına karşı direnci.....   | 10        |
| 1.1.1.b. Probiyotik mikroorganizmaların epitel yüzeylere tutunumu.....                                               | 12        |
| 1.1.2. Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığı üzerine etkisi.....                                              | 15        |
| <b>2. LİTERATÜR ÖZETİ.....</b>                                                                                       | <b>22</b> |
| <b>3. MATERYAL ve METOD.....</b>                                                                                     | <b>31</b> |
| 3.1. Materyal.....                                                                                                   | 31        |
| 3.2. Metod.....                                                                                                      | 34        |
| 3.2.1. Mikrobiyolojik deneyler.....                                                                                  | 35        |
| 3.2.1.a. Turşu izolatlarının bazı kültürel özelliklerinin incelenmesi .....                                          | 35        |
| 3.2.1.b. Mide ortamında gelişimin incelenmesi .....                                                                  | 36        |
| 3.2.1.c. Safra tuzlarına direncin belirlenmesi .....                                                                 | 37        |
| 3.2.1.d. Farklı sıcaklıklarda gelişimin incelenmesi .....                                                            | 38        |
| 3.2.2. Bağırsak yüzeyine tutunumun belirlenmesi .....                                                                | 39        |
| 3.2.2.a. Hücre hatlarının çözündürülmesi, pasajlanması ve dondurulması .....                                         | 39        |
| 3.2.2.b. Hücre sayımı ve ekimi.....                                                                                  | 40        |
| 3.2.2.c. Suşların bağırsak hücreleriyle muamelesi .....                                                              | 41        |
| 3.2.3. İstatistiksel analizler .....                                                                                 | 44        |

|                                                |           |
|------------------------------------------------|-----------|
| <b>4. ARAşTIRMA BULGULARI ve TARTIşMA.....</b> | <b>45</b> |
| <b>5. SONUÇ.....</b>                           | <b>62</b> |
| KAYNAKLAR .....                                | 65        |
| ÖZGEÇMİş .....                                 | 73        |



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

|     |                                           |
|-----|-------------------------------------------|
| °C  | Santigrat Derece                          |
| µL  | Mikrolitre                                |
| µm  | Mikrometre                                |
| kob | Koloni Oluşturan Birim                    |
| mL  | Mililitre                                 |
| nm  | Nanometre                                 |
| pH  | Asitlik Bazlık Birimi (Power of hydrogen) |
| v   | Hacim                                     |
| w   | Ağırlık                                   |

### Kısaltmalar

|         |                                              |
|---------|----------------------------------------------|
| CRC     | Kolorektal Kanser                            |
| DCA     | Deoxycholic Acid                             |
| DMSO    | Dimetilsülfoksit                             |
| EDTA    | Etilendiamin Tetraasetik Asit                |
| EPS     | Ekzopolisakkarit                             |
| FAO     | Food and Agriculture Organization            |
| GİS     | Gastrointestinal Sistem                      |
| HCl     | Hidroklorik Asit                             |
| HCT-116 | Human Colon Carcinoma                        |
| HDL     | Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein                |
| Ht-29   | Homo Sapiens Colon Colorectal Adenocarcinoma |
| IgA     | İmmünoglobulin A                             |
| İBH     | İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı              |

|      |                                                         |
|------|---------------------------------------------------------|
| LAB  | Laktik Asit Bakterileri                                 |
| NaCl | Sodyum Klorür                                           |
| PBS  | Phosphate Buffered Saline                               |
| PCR  | Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction) |
| RPM  | Revolutions per Minute                                  |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute                         |



## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1. Probiyotiklerin Etki Mekanizması .....                                                                          | 7  |
| Şekil 1.2. Gastrointestinal (GİS) sistemde bulunan mikroorganizmalar .....                                                 | 18 |
| Şekil 3.1. Canlandırma işlemi için çizimi yapılan suşlar.....                                                              | 35 |
| Şekil 3.2. Safra tuzlarına dayanıklılık testinde kullanılan 96'lık plate.....                                              | 38 |
| Şekil 3.3. Safra testinde plate okuma işlemine ait örnek excel dosyası.....                                                | 38 |
| Şekil 3.4. Farklı sıcaklıklarda gelişimin incelenmesine ait örnek plate okuma.....                                         | 39 |
| Şekil 3.5. Flaska ekilen ve yapışan HCT-116 hücre hattının invert mikroskop altındaki görüntüsü .....                      | 40 |
| Şekil 4.1. <i>Lactobacillus plantarum</i> RN154 suşunun mikroskopik görüntüsü.....                                         | 54 |
| Şekil 4.2. Hücre sayımı sonucunda gözlemlenen ölü ve canlı hücreler.....                                                   | 54 |
| Şekil 4.3. Uygulama öncesi hücre hatlarının görüntüsü (A: HCT-116, B:HT-29).....                                           | 55 |
| Şekil 4.4. Bakteri suşları ile uygulama sonrası HCT-116 hücrelerine ait görüntü (A: RN107, B: RN154) .....                 | 56 |
| Şekil 4.5. Bakteri suşları ile uygulama sonrası HT-29 hücrelerine ait görüntü (A: RN107, B: RN154).....                    | 57 |
| Şekil 4.6. Yıkama işlemi sonrası HCT-116 hücre hattının mikroskopik görüntüsü.....                                         | 58 |
| Şekil 4.7. RN107 ve RN154 numaralı suşların, HCT-116 ile HT-29 hücre hatlarına tutunum kapasitelerine (%) ait grafik ..... | 59 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 1.1.</b> Bazı probiyotiklerin keşif zaman çizelgesi.....                              | 2  |
| <b>Çizelge 1.2.</b> Bazı ülkelerde probiyotik ürünlerin tanımlamalar.....                        | 3  |
| <b>Çizelge 1.3.</b> Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar.....                          | 8  |
| <b>Çizelge 1.4.</b> Probiyotik mikroorganizmaların etkili olduğu bazı hastalıklar .....          | 16 |
| <b>Çizelge 3.1.</b> Çalışmada kullanılan turşu orijinli laktik asit bakterileri .....            | 31 |
| <b>Çizelge 4.1.</b> Turşu kökenli bakteri suşlarının bazı fenotipik ve probiyotik özellikleri... | 47 |

## 1. GİRİŞ

2001 yılında, Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından üzerinde uzlaşılan tanıma göre; probiyotikler, yeterli miktarda alındığı zaman konakçı üzerinde sağlığa yararlı etkilere sahip olan tek veya karışık kültürlerden oluşan canlı mikroorganizmalardır. Probiyotikler, sindirim sisteminde mikrobiyal dengeyi düzenleyerek işleyişi olumlu bir şekilde etkileyen canlı mikrobiyal katkılardır. Bu probiyotik tanımları, insan ve hayvan sağlığını güçlendiren ve gıda, gıda katkı maddeleri veya yemlere katılan mikrobiyal preparatların tamamını içermektedir. 1953 yılında, bu canlı mikroorganizmalar resmi olarak “probiyotikler” şeklinde adlandırılmışlardır. Latince kökenli bir kelime olan probiyotik terimi; “for life” yani “yaşam için” anlamına gelen “*pro*” ve “*biota*” olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır (Tharmaraj and Shah 2003; Uymaz 2010; Çetin *et al.* 2011; Reid 2016).

İnsanların probiyotiklerle tanışması çok eskilere dayanmaktadır. Probiyotikler ilk kez MÖ 3000’li yıllarda fermente gıdaların tüketimi ile kullanılmışlardır. Bu yönü ile probiyotikler yeni bir keşif değildir. Probiyotik terimini ise ilk olarak Alman bakteriyolog Werner Georg Kollath kullanmıştır. Şimdiye kadar probiyotikler birçok kişi tarafından araştırılmış olmakla beraber ilk önemli çalışmalar 20. yüzyılın sonuna doğru Paris’te Henry Tissier ve Ellie Metchnikoff başta olmak üzere bir takım önemli biyolog tarafından yapılmaya başlanmıştır. Konunun önemine binaen o zamandan beri probiyotikler hakkında pek çok *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda keşfedilen başlıca probiyotik mikroorganizmalar ve keşif zamanları Çizelge 1.1’de belirtilmiştir (Yurdakök 2013; Anonim 2016; Priyodip *et al.* 2017).

**Çizelge 1.1.** Bazı probiyotiklerin keşif zaman çizelgesi (Priyodip *et al.* 2017)

| Tarih     | Mikroorganizma Adı                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1980-2000 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Bacillus subtilis</i> (1907)</li> <li>• <i>Lactobacillus acidophilus</i>, <i>Bifidobacterium adolescentis</i> (1989)</li> <li>• <i>Lactobacillus casei</i> (1991)</li> <li>• <i>Bifidobacterium animals</i>, <i>Enterococcus hirae</i> (1992)</li> <li>• <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (1992)</li> <li>• <i>Enterococcus faecium</i> (1994)</li> <li>• <i>Bifidobacterium bifidum</i>, <i>Bifidobacterium breve</i>, <i>Bifidobacterium longum</i>, <i>Bifidobacterium angulatum</i> (1995)</li> <li>• <i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>, <i>Lactobacillus brevis</i> subsp. <i>coagulans</i> (1996)</li> <li>• <i>Lactobacillus johnsonii</i>, <i>Bacillus coagulans</i> (1998)</li> <li>• <i>Lactobacillus fermentum</i>, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (2000)</li> </ul> |
| 2000-     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Lactobacillus plantarum</i> (2001)</li> <li>• <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (2002)</li> <li>• <i>Escherichia coli</i> (2003)</li> <li>• <i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> (2004)</li> <li>• <i>Bifidobacterium infantis</i> (2006)</li> <li>• <i>Pediococcus pentosaceus</i>, <i>Bifidobacterium catenulatum</i>, <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (2008)</li> <li>• <i>Enterococcus durans</i> (2009)</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

Ülkemizde 100 yıl öncesine kadar ortalama 50 yıl olan insan ömrü, teknolojik ve tıbbi gelişmelerle birlikte 78 yıl olmuş ve yaklaşık olarak 28 yıl uzamıştır. Bu artış insanları daha sağlıklı yaşama eğilimine doğru itmiştir. İnsanlar artan yaşam sürelerinin yanı sıra yaşam kalitelerini de arttırmak istemektedirler. Bilim insanları sadece hastalıkları tedavi etmek yerine bu hastalıkların gelişimini önlemek için de yoğun bir şekilde çalışmaktadır. Günümüzde tüketicilerin beslenme-sağlık ilişkisi hakkında daha bilinçli hale gelmesi probiyotiklere verilen önemi de arttırmıştır. Yapılan çeşitli çalışmalarla probiyotiklerin birçok yararlı etkisinin olduğunun kanıtlanmasıyla probiyotik ürünler piyasada hızla yer almaya başlamıştır. Böylece probiyotik ürüne verilen değer ve bu alanda üretim yapan firma sayısı ile ürün çeşitliliği de son yıllarda hızla artmıştır (Akman 2009; Gürkan 2018).

Probiyotik gıda üreticileri, hızlı bir şekilde büyümekte olan probiyotik gıda pazarında kendi ürettikleri ürünlerini daha geniş bir tüketici kitlesine ulaştırmak istemektedirler. Bu amaçla probiyotik ürünler hakkında sağlıkla ilgili özel iddialarda bulunmaktan kaçınmamışlardır. Bu da bazı ülkelerin gıda güvenliğini sağlamak ve tüketiciyi korumak maksadıyla probiyotik ürünler için yeni tanımlar geliştirmesine neden olmuştur. Bazı ülkelerdeki probiyotik ürünlerle ilgili tanımlar Çizelge 1.2’de sunulmuştur (Ergin vd 2015).

**Çizelge 1.2.** Bazı ülkelerde probiyotik ürünlerin tanımlamaları (Arora *et al.* 2013; Ergin vd 2015)

| Ülke İsmi                    | Probiyotik Tanımı                    |
|------------------------------|--------------------------------------|
| Amerika Birleşik Devletleri  | Gıda/ Besin Tamamlayıcı/ İlaç/ Canlı |
| Japonya/ Çin/ Malezya        | Fonksiyonel Gıda                     |
| İtalya                       | Diyet Gıda                           |
| Kanada                       | Doğal Sağlık Ürünleri                |
| Danimarka/ İsveç/ Finlandiya | Gıda Takviyesi                       |
| Belçika/ Almanya             | Biyoterapötik Ajan                   |

Probiyotik denilince her ne kadar insanların aklına süt ürünleri gelse de, meyve-sebze gibi diğer gıda ürünleri de probiyotik kaynağı olabilmektedir. Ayrıca günümüzde probiyotik mikroorganizmalar kurutma gibi bazı işlemlerle kapsül veya tablet haline getirilerek de tüketicinin hizmetine sunulmaktadır (Sağdıç vd 2003; Peres *et al.* 2012).

Turşu; lahana, salatalık, havuç, pancar, yeşil domates, şalgam, fasulye gibi sebzelerin laktik asit bakterileri ile fermente edilmesiyle üretilen, uzun süre dayanabilen geleneksel bir ürünüdür. Ayrıca eski çağlardan beri kullanılan gıda saklama yöntemlerinden biridir. Turşu kelimesi Farsça bir kelime olan ve ekşi anlamına gelen “torsh” dan gelmektedir. Türk mutfağının vazgeçilmez bir unsuru olan turşu sade veya karışık olarak üretilir. Genellikle ülkemizde karışık turşu yapımında lahana, salatalık, havuç, yeşil domates, biber ve sarımsak kullanılır. *Lactobacillus plantarum*, turşu üretimindeki en önemli mikroorganizmadır (Daeschel *et al.* 1987; Kabak 2009; Kabak and Dobson 2011; Çetin 2011).

Farklı ülkelerde de Kimchi (Kore), Sauerkraut (Almanya), Burong mustasa (Filipinler), Dakguadong (Tayland) gibi turşu benzeri ürünler üretilmektedir. Ancak bizim anladığımız özellikteki turşu üretimi Anadolu, Ortadoğu ve Balkan ülkelerinde görülmektedir (Aktan vd 1998; Breidt *et al.* 2013).

Ülkemizde meyve ve sebze üretiminin giderek artması sebebiyle turşu sanayi her geçen gün gelişmektedir. Buna karşın turşu mikrobiyolojisi üzerine çok az sayıda çalışma bulunmaktadır (Aktan vd 1998).

### **1.1. Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar**

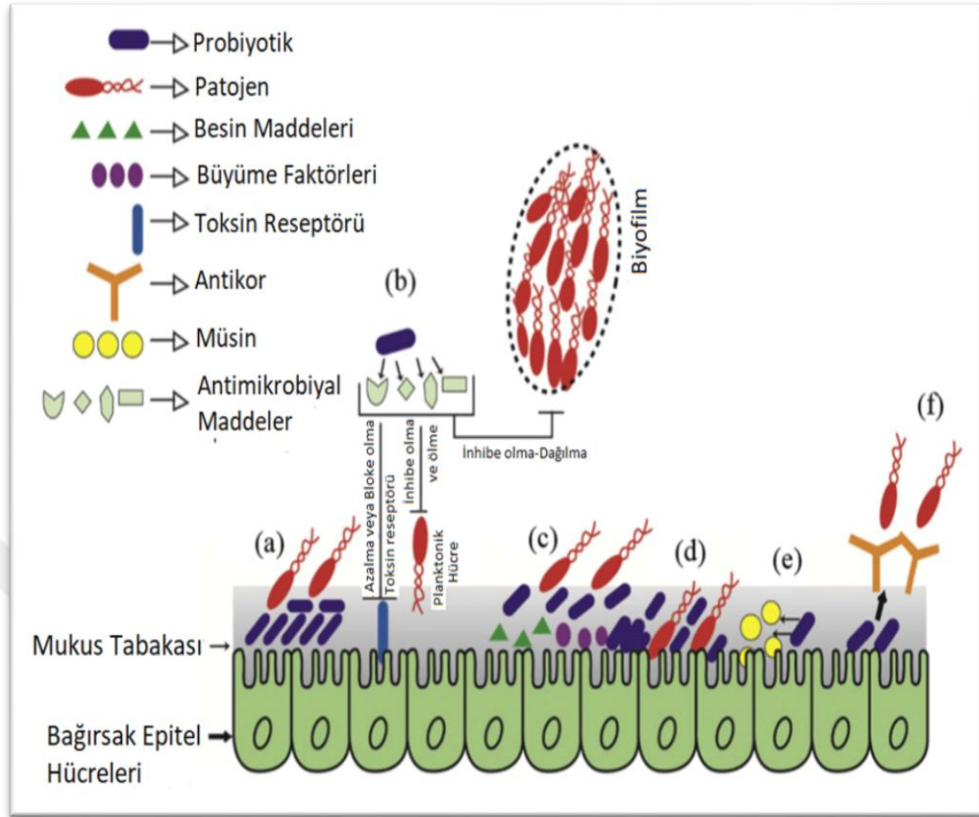
Probiyotik bakteriler genellikle Gram (+) ve sporsuz bakterilerdir. Genel olarak probiyotik bakteriler optimum 35-38°C’de sıcaklıklarda ve pH 5,5-6 aralığında en iyi gelişimi gösterirler. Literatür incelendiğinde çeşitli kaynaklardan izole edilmiş ve probiyotik olduğu kanıtlanmış farklı birçok suş olduğu görülmektedir (Ceyhan ve Alıç 2012).

Probiyotik mikroorganizmaların çoğu, özellikle insan bağırsak mikroflorası için çok büyük öneme sahip olan “laktik asit bakterileri” (LAB) gurubuna dâhildir. Bu yüzden probiyotik bakterilerle ilgili yapılan çalışmalarda genellikle laktobasillere ağırlık verilmiştir. *Lactobacillus* cinsine ait mikroorganizma türleri yaygın olarak GRAS (Generally Regarded As Safe) olarak kabul edilmektedir. Özellikle fermente ürünlerin hazırlanmasında büyük öneme sahiptirler. Laktik asit bakterileri gram pozitif, katalaz ve oksidaz negatif, hareketsiz, kok veya çubuk şeklindedirler. Birisi hariç (*Sporolactobacillus*) spor oluşturmazlar.

Yaygın olarak kullanılan diğer bir probiyotik mikroorganizma gurubu *Bifidobacterium* türleridir. Bugüne kadar Bifidobakterler en çok ilgi gören probiyotik mikroorganizma olmuştur. Bifidobakterler anne sütüyle beslenen bebeklerin bağırsak mikroflorasının %95’ini oluşturur. *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus casei* en çok bilinen probiyotik bakteri isimleridir. *Lactobacillus acidophilus* diğer probiyotik bakterilere oranla yüksek oksidasyon redüksiyon potansiyeline, antimikrobiyal maddelere ve düşük yüzey gerilimine daha fazla dirençlidir. Laktobasiller ve bifidobakterler laktozu fermente ederler. Bu nedenle bu kültürler kullanılarak hazırlanan süt ürünleri diğer süt ürünlerinden daha fazla laktik asit ihtiva eder. Ayrıca bu kültürler kullanılarak hazırlanan gıda ürünlerinde bu bakteriler tiamin, folik asit gibi B grubu vitaminlerini ve K vitaminini ürettikleri için bu gıdalar vitamince daha zengindir. Yine bu probiyotik bakteriler sindirim sisteminde demir, fosfor gibi bazı mineral maddelerin emiliminde de rol oynamaktadır.

Probiyotik çalışmaları her ne kadar bakteriler üzerine yoğunlaşmışsa da maya ve küflerinde probiyotik açıdan incelendiği de görülmektedir. *Saccharomyces boulardii* probiyotik olarak bilinen ilk mayadır. *Saccharomyces boulardii* gibi bazı probiyotik mikroorganizmalar gıdalarda yaygın olarak kullanılmalarına karşın insan orjinli değildirler (Bullen and Willis 1971; Salminen *et al.* 1998; Dunne 2001; Kundakçı ve Ergönül 2006; Uymaz 2010; Anonim 2018; Anonim 2019).

Probiyotik olarak kullanılan bir mikroorganizma, patojenik ve toksijenik olmamalıdır. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda *Lactobacillus paracasei* gibi bazı probiyotik mikroorganizmaların patojenik özellikte olduğu belirlenmiştir. Bu yüzden kullanılacak probiyotik mikroorganizmaların patojenite açısından dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi gerekir. Yine enterekoklar da patojen mikroorganizmalardır ve antibiyotik direnç genlerine sahiptirler. Fakat yapılan birçok araştırma ilgili testlerin ardından *E. faecium* ve *E. faecalis* gibi suşların probiyotik olarak güvenle kullanılabileceğini kanıtlamıştır. Ayrıca probiyotik mikroorganizmalar konakçı sağlığına olumlu etkiler yapmalıdır, GRAS statüsünde mikroorganizmalar olmalıdır, tercihen insan orjinli olmalıdır, immün cevabı stimüle edebilmelidir, düşük pH seviyesi ve safra tuzları gibi mikroorganizma gelişimini olumsuz etkileyen koşullarda stabil kalarak bağırsakta metabolize olmalıdır, patojenik ve kanserojenik bakterilerin gelişimini engellemelidir, antimikrobiyal maddeler salgılayabilmelidir (yani antagonist etki göstermelidir), istenen bazı metabolik etkiler gösterebilmelidir (laktaz aktivitesi gibi), gıdalara ilave edildiği zaman gıdanın kalitesini olumsuz bir şekilde etkilememelidir ve bağırsak mukozasına tutunabilme yeteneğine sahip olmalıdır. Tutunum probiyotik mikroorganizmaların en önemli özelliğidir. Çünkü patojen ve toksik olmayan bu probiyotik mikroorganizmalar, tüketim sonrasında konakçı metabolizmasında yer aldığı ölçüde yarar sağlamaktadır. Probiyotiklerin, özellikle gıda işlemede kullanılan çeşitli teknolojik işlemlere de dayanıklı olmaları beklenmektedir. Probiyotik mikroorganizmaların bağırsaktaki etki mekanizması Şekil 1.1’de ayrıntılı olarak gösterilmiştir ve Çizelge 1.3’de de probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar gösterilmiştir (Collins *et al.* 1998; Salminen *et al.* 2003; Gürsoy vd 2005; Franz *et al.* 2011; Ceyhan ve Alıç 2012; Hossain *et al.* 2017; Taşdemir 2017).



**Şekil 1.1.** Probiyotiklerin Etki Mekanizması (Hossain *et al.* 2017)

- a) Mukoza tabakasına ve epitel yüzeye yapışmak için patojenlerle rekabet. b) Antimikrobiyal madde üretimi. c) Besin maddeleri ve büyüme faktörleri için rekabet. d) Bağırsak mukozasının yapışma özelliğini artırma. e) Epitelin bariyer özelliğini destekleme. f) IgA düzeyini arttırarak bağışıklığı destekleme.

**Çizelge 1.3.** Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar (Salminen vd 1998; Ceyhan ve Aliç 2012)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b><i>Lactobacillus</i> Türleri</b><br><i>Lactobacillus bulgaricus</i><br><i>Lactobacillus lactis</i><br><i>Lactobacillus acidophilus</i><br><i>Lactobacillus gasseri</i><br><i>Lactobacillus cellobiosus</i><br><i>Lactobacillus delbrueckii</i><br><i>Lactobacillus reuteri</i><br><i>Lactobacillus curvatus</i><br><i>Lactobacillus fermentum</i><br><i>Lactobacillus plantarum</i><br><i>Lactobacillus johnsonii</i><br><i>Lactobacillus rhamnosus</i><br><i>Lactobacillus helveticus</i><br><i>Lactobacillus salivarius</i><br><i>Lactobacillus brevis</i><br><i>Lactobacillus casei</i><br><i>Lactobacillus crispatus</i> | <b><i>Streptococcus</i> Türleri</b><br><i>Streptococcus cremoris</i><br><i>Streptococcus thermophilus</i><br><i>Streptococcus intermedius</i><br><i>Streptococcus lactis</i><br><i>Streptococcus diacetylactis</i> |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <b><i>Bacteriodes</i> Türleri</b><br><i>Bacteriodes capillus</i><br><i>Bacteriodes suis</i><br><i>Bacteriodes ruminicola</i><br><i>Bacteriodes amylophilus</i><br><i>Bacterioides uniformis</i>                    |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <b><i>Escherichia</i></b><br><i>Escherichia coli</i> Nissle 1917                                                                                                                                                   |
| <b><i>Pediococcus</i> Türleri</b><br><i>Pediococcus cerevisiae</i><br><i>Pediococcus acidilactici</i><br><i>Pediococcus pentosaceus</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | <b><i>Propionibacterium</i> Türleri</b><br><i>Propionibacterium shermanii</i><br><i>Propionibacterium freudenreichii</i><br><i>Propionibacterium jensenii</i>                                                      |
| <b><i>Leuconostoc</i></b><br><i>Leuconostoc mesenteroides</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | <b><i>Peptostreptococcus</i></b><br><i>Peptostreptococcus productus</i>                                                                                                                                            |

Çizelge 1.3 (devam)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b><i>Bacillus</i> Türleri</b><br><i>Bacillus subtilis</i><br><i>Bacillus pumilus</i><br><i>Bacillus lentus</i><br><i>Bacillus licheniformis</i><br><i>Bacillus coagulans</i><br><i>Bacillus cereus</i><br><i>Bacillus clausii</i><br><i>Bacillus laterosporus</i><br><i>Bacillus polyfermenticus</i> | <b><i>Bifidobacterium</i> Türleri</b><br><i>Bifidobacterium bifidum</i><br><i>Bifidobacterium breve</i><br><i>Bifidobacterium adolescentis</i><br><i>Bifidobacterium infantis</i><br><i>Bifidobacterium longum</i><br><i>Bifidobacterium thermophilum</i><br><i>Bifidobacterium animalis</i><br><i>Bifidobacterium catenulatum</i><br><i>Bifidobacterium lactis</i> |
| <b><i>Akkermansia</i></b><br><i>Akkermansia muciniphila</i>                                                                                                                                                                                                                                           | <b><i>Enterococcus</i> Türleri</b><br><i>Enterococcus faecalis</i><br><i>Enterococcus faecium</i>                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b><i>Faecalibacterium</i></b><br><i>Faecalibacterium prausnitzii</i>                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b><i>Mayalar</i></b><br><i>Saccharomyces cerevisiae</i><br><i>Candida torulopsis</i><br><i>Saccharomyces boulardii</i>                                                                                                                                                                               | <b><i>Küfler</i></b><br><i>Aspergillus niger</i><br><i>Aspergillus oryzae</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

#### 1.1.1. Probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmaların belirlenmesinde başvurululan *in vitro* testler

Probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizma suşlarının belirlenmesi ve insan beslenmesinde güvenle kullanılabilmesi için bir takım *in vitro* ve *in vivo* testlerin yapılması gerekmektedir. Bu amaçla yapılan *in vitro* testler;

- Mide ortamına direnç,
- Safra tuzlarına tolerans,

- Antimikrobiyal maddeler,
- Antibiyotik direnci,
- Kolesterol asimilasyonu ve
- Bağırsak yüzeyine tutunmadır (Hummel *et al.* 2007; Elcioglu ve Kunduhoglu 2014; Çomak-Göçer 2016).

Probiyotikler tarafından üretilen organik asitler, yağ asitleri, hidrojen peroksit ve bakteriyosin gibi bazı metabolik bileşikler antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Antimikrobiyal etkileri sayesinde probiyotikler, bağırsakta bazı mikroorganizmaların çoğalmasını kontrol altına alabilmektedir (Paul ve Jakki 2008).

Antibiyotik direnci probiyotik mikroorganizmalarda istenen bir özellik değildir. Çünkü antibiyotik direnci bir mikroorganizmadan diğerine aktarılabilir. Gastrointestinal sistemde patojenler ve probiyotikler bir arada bulunduğundan bu özellik büyük bir risk taşımaktadır (Hummel *et al.* 2007).

Yapılan çalışmalar probiyotiklerin kandaki kolesterol seviyesini düşürdüğünü kanıtlamıştır. Kolesterol asimilasyonu testide muhtemel probiyotik mikroorganizmanın bu özelliğini belirlemek için yapılmaktadır (Walker and Gilliland 1993; Alp ve Ertürkmen 2017).

#### **1.1.1.a. Probiyotik mikroorganizmaların mide sıvısının asidik koşullarına ve safra tuzlarına karşı direnci**

Probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmaların asit ve safra tuzlarına dirençli olması, sindirim sisteminden geçerken canlı olarak kalabilmesi ve bağırsakta kolonizasyonu için gereklidir. Bu sayede probiyotik mikroorganizmalar gastrointestinal sistemde zarar görmeden bağırsağa ulaşabilir ve bağırsak epitel hücrelerine yapışabilir (Dunne *et al.* 2001; Chen *et al.* 2011).

Mide sıvısının pH değeri sağlıklı bireylerde pH 2-3 arasındadır. Bu sıvının içinde gastrik asit (HCl) ve sindirim enzimleri bulunmaktadır. Bu kadar yüksek asidik ortam sindirim sisteminde geçişler için bir kontrol noktası oluşturur ve birçok mikroorganizmayı etkisiz hale getirerek bağırsağa ulaşmasını engeller. Faydalı işlevleri olan probiyotik mikroorganizmaların bağırsaklara ulaşip tutunabilmesi için önce asidik mide ortamından geçerken hayatta kalması gereklidir. Örneğin bir probiyotik bakteri olan *Lactobacillus acidophilus* pH 2’de en az 90 dakika kalabilmektedir, buda bağırsağa ulaşması için yeterli bir süredir (Önal vd 2005; Chen *et al.* 2011; Séraphin and Hettich 2012; Pereira *et al.* 2018; Çiftçi 2019).

Muhtemel probiyotik mikroorganizmaların mide ortamına direncini belirlemek için mide simülasyon çözeltisi hazırlanmaktadır. Böylece mide ortamıyla birebir aynı olan çözelti içerisinde belirli süre ve sıcaklıkta bekletilen mikroorganizmaların bu ortama dayanıklılığı belirlenebilmektedir (Argyri *et al.* 2013; Elcioglu ve Kunduhoglu 2014).

Safra; karaciğerden salgılanan ve safra kesesinden on iki parmak bağırsağına gönderilen bir sindirim salgısıdır. İçinde yaklaşık %50 oranında safra tuzlarını barındırır. Safra tuzları yağların sindiriminde ve emiliminde önemli bir rol oynar. Bakterilerin hücre membranları büyük oranda lipit ve yağ içerdiği için safra tuzları bakteriler üzerinde (özellikle *E. coli*, *Klebsiella* ve *Enterococcus* türleri için) antibakteriyel etkiye sahiptir. Gram-pozitif bakteriler gram-negatif bakterilere oranla safra tuzlarına karşı daha hassastır. Ayrıca yapılan *in vitro* çalışmalar bifidobakterlerin laktobasillere göre safra tuzlarına karşı daha dirençli olduğunu göstermiştir (Hill and Draser 1968; Üçok vd 2010; Engüdar 2012).

Muhtemel probiyotiklerin safra tuzuna karşı toleransı *in vitro* analizlerle belirlenebilmektedir. Bu amaçla yapay safra ortamı hazırlanarak laboratuvar şartlarında probiyotik mikroorganizmaların bu ortama dayanıklılığı belirlenebilmektedir (Prasad *et al.* 1998; Dunne *et al.* 2001; Uymaz 2010; Önal-Darılmaz 2010; Zago 2011).

Günümüzde ağızdan başlayarak kalın bağırsağa kadar uzanan yani tüm sindirim sistemini kapsayan simülasyon model sistemleri üzerinde de yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Çomak-Göçer vd 2016; TNO 2017).

Probiyotikler ekzopolisakkarit (EPS) üretim kapasitesine sahiptir. EPS üretimi ile bakteriler gastrointestinal sistemde, asitliğe, safra tuzlarına ve bağırsaktaki çeşitli olumsuz koşullara karşı daha dirençli hale gelebilmektedirler. Yüksek EPS üretimine sahip bakteri suşlarında agregasyon kapasitesinin arttığı tespit edilmiştir. Bu sayede bağırsak epitel hücrelerine daha iyi tutunup kolonize olabilmektedirler (Önal-Darılmaz 2010).

#### **1.1.1.b. Probiyotik mikroorganizmaların epitel yüzeylere tutunumu**

Mide asidi ve safra tuzlarını zarar görmeden geçebilen probiyotik mikroorganizmalar bağırsağa ulaştığında, bağırsaktaki peristaltik hareketler sonucunda bağırsaktan uzaklaşmaması için mikroorganizmaların mukus tabakasına ve epitel hücrelerine tutunması yani yapışması gerekir. Çünkü epitel hücrelerine yapışmayan probiyotik bakteriler dışkı yoluyla vücuttan uzaklaşır ve beklenen hiçbir faydayı sağlayamaz. Bu nedenle tutunma ve kolonizasyon probiyotik seçimindeki en önemli etmendir. Kolonizasyon ile probiyotik mikroorganizmaların canlı vücudundaki etkinliği artmaktadır. Mikroorganizmaların bağırsakta epitel hücrelere yapışması, hücre yüzeyinin hem agregasyon kapasitesi hem de hidrofobik özellikleri ile alakalı olmaktadır. Hidrofobisite yüzey yükleriyle ilgilidir ve agregasyonla doğrudan bir bağlantısı yoktur. Agregasyon özelliği sayesinde birbirlerine ve hücre epiteline iyi bir şekilde tutunabilirler ve kolonize olabilirler. Aynı türdeki mikroorganizmaların birbirine tutunmasına otoagregasyon denir ve bu probiyotik mikroorganizmaların epitel hücreye tutunumu için çok önemlidir. Farklı türe ait mikroorganizmaların birbirine tutunmasına ise koagregasyon denir. Bu özellik ise patojenlerin bağırsak epiteline tutunarak kolonize olmalarını önler. Hücrelerin otoagregasyon kapasitesi, PBS (phosphate-buffered saline) içerisinde bulunan mikroorganizma suşlarının belirli zaman aralıklarında ve belirli bir dalga boyunda absorbansının ölçülmesi ile belirlenen basit bir yöntemdir. Hücre yüzeyi

hidrofobisitesi ise hidrokarbonlu su ile mikroorganizma süşunun karıştırılması ve 600 nm dalga boyunda absorbandsın ölçülmesi ile belirlenir. Bu analizler sonucunda probiyotik mikroorganizmanın epitel yüzeylere yapışma yeteneği hakkında fikir edinilmiş olunur. Tutunumu belirlemenin en net yolu *in vivo* çalışmalardır. *In vivo* çalışmalarla probiyotiklerin gastrointestinal sistemdeki işlevleri daha iyi anlaşılabilir. Ancak özellikle insanda yapılacak *in vivo* bakteri çalışmalarında meydana gelebilecek zorluklar, canlı sağlığı açısından doğabilecek riskler, artan maliyet ve *in vitro* analizlerin daha hızlı olması sebebiyle mikrobiyal yapışmayı belirlemek için *in vitro* model sistemi yani hücre kültürü metodu geliştirilmiştir. Böylece Caco-2 (kolon adeno karsinoma hücresi), HT-29 (kolon adeno karsinoma hücresi), fetal I-407 gibi memeli epitel hücreleri kullanılarak mikrobiyal adezyon (yapışma) doğrudan belirlenmiş olur. Caco-2 epitel hücreleri sadece probiyotik mikroorganizmaların tutunumuyla ilgili çalışmalarda değil, aynı zamanda probiyotik mikroorganizmaların patojen bakterilerle nasıl rekabet ettiklerini araştıran çalışmalarda da kullanılmıştır. Bu hücreler bağırsakta bulunun villus hücreleriyle aynı özelliklere sahip olduğu için bu tür çalışmalarda çok sık kullanılmaktadırlar (Önal vd 2005; Billoo vd 2006; Maragkoudakis vd 2006; Önal-Darılmaz 2010; Pereira *et al.* 2018; De Melo Pereira *et al.* 2018; Vemuri *et al.* 2018).

Doku kültürü *in vitro* ortamda organ, doku veya hücrelerin belirli bir sıcaklıkta, uygun koşulların sağlanması amacıyla bir inkübatör içerisinde, gerekli besin ve büyüme faktörlerini içeren besiyeri kullanılarak kültür edilmesine denir. Doku kültürü terimi hem organ kültürünü (ayrıştırılmamış dokuların üç boyutlu kültürü) hem de hücre kültürünü (primer veya hücre dizilerinden elde edilmiş hücrelerin kültürü) kapsar. 1800'lü yıllarda ilk hücre kültürü çalışmaları başlamıştır. Hücre kültürü alanında yapılan çalışmalar 1950'lerden sonra geliştirilen besiyerleri ve antibiyotik kullanımı ile tekrarlanabilir ve standart hale gelmiştir. Bu sayede canlı vücudundan bağımsız olarak, belirlenen şartlar altında tutulabilen hücrelere istenen uygulamalar yapılmakta ve sonuçları daha objektif olarak, canlıda olumsuz herhangi bir etki olmaksızın izlenebilmektedir. Literatür incelendiğinde doku kültürü uygulamalarının tıp ve veterinerlik alanında uzun yıllardan beri kullanılmakta olduğu, gıda biliminde ise

uygulamaların doksanlı yıllardan sonra başladığı görülmektedir. Probiyotik bakterilerin bağırsak epitel hücrelerine tutunumu ile ilgili araştırmalar hücre kültürü çalışmalarında geniş yer kaplamaktadır (Ark vd 2017; Arıcan 2019).

Bakterilerin bağırsak epitel hücrelerine tutunumunda bakterilerin yüzeyinde bulunan bazı moleküller rol oynamaktadır. Probiyotik bakterilerin epitel hücrelere yapışmasında rol alan yardımcı moleküller, türler arasında farklılık göstermektedir. Yapılan çalışmalarda *Bifidobacteria*' ların epitel hücrelere yapışmasında *proteinaceus* adında bir proteinin aracılık ettiği gözlemlenmiştir. *Lactobasiller*'in tutunumu ise protein ve karbonhidrattan oluşan bir mekanizmadan kaynaklanmaktadır (Önal vd 2005; Séraphin and Hettich 2012; Pereira *et al.* 2018).

Mukus, bağırsaktaki mukozal bezler ve goblet hücreleri tarafından salgılanan ve epitel hücreleri kaplayan bir yapıdır. Mukusun yapısında, epitel hücrelerin bileşiminde yer alan protein ve lipitler bulunur. Mikroorganizmalar bağırsağa ulaştığında ilk temasları mukusla olur. Bu nedenle mukus, tutunma ve kolonizasyon için önemli bir yer olarak görülür. Ekstra selüler matrix (ECM) epitel altında bulunan bir yapıdır ve hücrelerin yapışmasında rol oynar. Patojen mikroorganizmalar epitel hücrelere yapışıp zarar vererek bu tabakanın altında bulunan ECM'ye ulaşır. Ancak ortamda probiyotik bakteriler varsa bunlar ECM'ye yapışarak patojenlerin zarar vermesini engelleyebilir. Bu sayede epitel kendini onarabilir. Literatür incelendiğinde probiyotik bakterilerin insan vücudunda gastrointestinal yollardaki etki mekanizmaları hakkında pek çok araştırma yapıldığı görülmektedir. Probiyotiklerin bu etki mekanizmaları anlaşıldıkça insan sağlığı için neden yararlı ve önemli olduğu da daha iyi anlaşılabilecektir. Probiyotik mikroorganizmaların epitel hücrelere ve bağırsak mukozasına tutunması, patojenlerin tutunumunu engellemesi, immün sistemin aktive edilmesi, zarar gören mukozanın iyileşmesine katkı sağlaması ve probiyotik etkinin daha uzun sürmesi açısından önemli olabilmektedir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda *Lactobacillus* türlerinin epitel hücrelere tutunmasında aşağıda belirtilen faktörlerin etkili olduğu görülmüştür.

- Hidrofobisite ve ekstraselüler proteinler ve bakteri hücresi üzerindeki karbonhidratlar, tutunmaya yardımcı olur.
- Mikroorganizma hücrelerinin proteaz enzimi ile muamelesi tutunmayı olumsuz bir şekilde etkiler.
- Bakteri hücrelerinin yüzeyinde bulunan karbonhidratların okside olması tutunmayı azaltır.
- Düşük pH ve pepsinle muamele edilen bakterilerde tutunma yeteneği büyük ölçüde azalır.
- Bakteri hücrelerinin mannozla muamelesi tutunmayı azaltır.
- Bakterilerin yetiştirme ortamındaki serbest yağ asitleri, hem bakterilerin gelişimini hem de tutunumunu olumsuz bir şekilde etkiler.
- Bakterilerin yetiştirme ortamı tutunma yeteneğini büyük ölçüde etkileyen faktörlerden biridir.
- Hidrofobik etkileşimler de tutunmayı önemli ölçüde etkiler (Ross vd 1996; Önal vd 2005; Doğan 2012).

### **1.1.2. Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığı üzerine etkisi**

Bakterilerin canlı vücuduna zarar verdiği ve çeşitli hastalıklara yol açtığı fikri yıllarca doğru olarak kabul edilmiştir. Ancak yapılan birçok çalışma bazı mikroorganizmaların insan ve hayvanlardaki çeşitli hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde kullanılabileceğini göstermiştir (Goldin 1998; Taşdemir 2017).

Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığı üzerine olumlu etkileri uzun yıllardan beri bilinmektedir ve bu olumlu etkiler bilimsel olarak ispatlanmıştır. Bu konuda yıllardır yapılan çalışmalar sayesinde intestinal floradaki bakterilerin sağlık açısından ne kadar önemli olduğu günümüzde daha iyi anlaşılmaktadır. Özellikle günümüzde antibiyotik direncinin çok hızlı bir şekilde artması probiyotik kullanımına gösterilen ilginin artmasına neden olmuştur. Bu nedenle sağlıklı bir yaşam sürmek ve vücut direncini arttırarak hastalıklarla daha iyi savaşabilmek için probiyotik kullanımı önerilmektedir. Probiyotik mikroorganizmaların tedavisinde olumlu katkılar sağladığı çeşitli hastalıklar

Çizelge 1.4’de kısaca belirtilmiştir (Laurens-Hattingh and Viljoen 2001; Sullivan and Nord 2005; Demirören ve Özen 2012)

**Çizelge 1.4.** Probiyotik mikroorganizmaların etkili olduğu bazı hastalıklar (Ceyhan ve Aliç 2012; Kav 2019)

| Hastalık Adı                                                                                                         | Hastalık Adı                                                                                                                                           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kanser                                                                                                               | Depresyon                                                                                                                                              |
| Kalp Rahatsızlıkları                                                                                                 | Otoimmün Hastalıklar                                                                                                                                   |
| Diyare <ul style="list-style-type: none"> <li>• Antibiyotik İlişki</li> <li>• Bakteriyel</li> <li>• Viral</li> </ul> | İnflamatuvar Hastalıklar <ul style="list-style-type: none"> <li>• İBH (İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı)</li> <li>• Allerji</li> <li>• Astım</li> </ul> |
| Karaciğer Yağlanması                                                                                                 | İnfeksiyöz Hastalıklar                                                                                                                                 |
| Obezite                                                                                                              | Yoğun Bakım <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pankreatit</li> <li>• Travma vb.</li> </ul>                                                       |
| Yaşlanma                                                                                                             | Laktoz İntoleransı                                                                                                                                     |

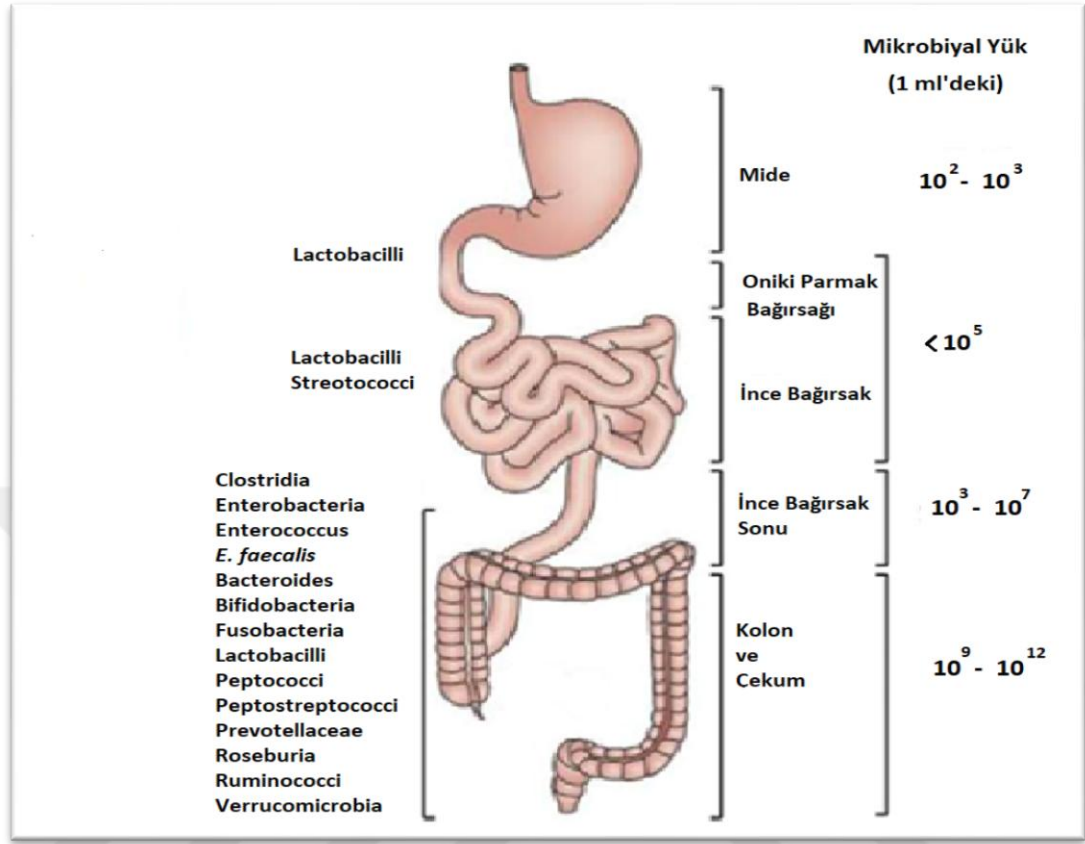
Günümüzde, insan vücudunda yaşayan mikrobiyal hücrelerin sayısının insan hücrelerinininkinden 10 kat daha fazla olduğu ve yaklaşık 350 trilyon gibi oldukça büyük sayılara ulaşabildiği tahmin edilmektedir. İnsan mikrobiyotası, başta bakteriler olmak üzere, protozoaları, arkeleri, virüsleri ve küfleri içerir. Kolonik mikrobiyota insan vücudundaki en çok mikroorganizmayı içeren alandır. Bağırsak, çeşitli mikroorganizmaları barındıran çok karmaşık bir ortamdır. Bağırsak, hem işlevleri nedeniyle hem de beyin ve sinir sistemi üzerindeki etkilerinden dolayı ikinci beyin olarak adlandırılmaktadır (Kav 2019).

Probiyotik mikroorganizmalar, vücut işleyişinde çok fazla işleve sahip olan bağırsaklar üzerinde bilimsel çalışmalarla da kanıtlanmış pek çok olumlu etkiye sahiptir. Probiyotiklerin bağırsak epiteline bazı faydalarını sıralayacak olursak;

- Mukus üretimini artırır,
- Zarar görmüş epitel hücrelerinin onarımına katkı sağlar,
- Epitel hücreler arasındaki direnci artırır ve bu sayede bütünlüğün korunmasına katkı sağlar,
- Epitel hücrelerin apoptozunu (programlanmış hücre ölümü) önler (Sullivan and Nord 2002).

İnsan bağırsağında yüzlerce mikroorganizma türü bulunmaktadır ve bağırsak mikroflorasının büyük çoğunluğunu bakteriler oluşturmaktadır. Bağırsak mikroflorası yeni doğan döneminde kazanılır ve sabit kalır. Ancak yaş, cinsiyet, stres, diyet, ilaç kullanımı ve çevre gibi bazı faktörler insan bağırsak mikroflorasının bileşimini değiştirebilmektedir. Birçok olumsuz faktörün etkisiyle bağırsak fizyolojik bütünlüğünü kaybeder ve bu durum mikroflorada faydalı mikroorganizmaların sayısının azalmasına, sağlığa zararlı veya patojenik mikroorganizmaların sayısının artmasına yani mikroflora dengesinin bozulmasına neden olur. Sonuç olarak konakçı, hastalıklara karşı çok daha duyarlı hale gelmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalar probiyotik kullanımının bağırsak florasında yararlı mikroorganizma sayısını arttırdığını, mikroflora dengesinin yeniden sağlanmasına ve böylece konakçının çeşitli gastrointestinal hastalıklardan korunmasına yardımcı olduğunu kanıtlamıştır. Gastrointestinal sistemde (GİS) bulunan bazı mikroorganizmalar ve bunların sayıları Şekil 1.2’de gösterilmiştir (Kasper 1998; Naidu *et al.* 1999; Fooks *et al.* 1999; Coşkun 2006).

İnsanların bağırsak mikroflorasında bulunan mikroorganizmaların yaklaşık %98’i insan sağlığı için yararlıdır ve sindirime büyük oranda yardımcı olurlar (Koca 2015).



**Şekil 1.2.** Gastrointestinal (GİS) sistemde bulunan mikroorganizmalar (Kav 2019)

Probiyotik bakteriler, antimikrobiyal maddeler salgılama, laktik asit üreterek ortam asitliğini artırma, bakteriyosin üretimini artırma, patojenlerin epitel hücrelere tutunmasını engelleme, serbest radikal üretme ve besin kaynakları için rekabet etme gibi çeşitli yollarla patojen mikroorganizmaları inhibe etmektedirler. Ayrıca probiyotik mikroorganizmalar antienfektif etki de göstermektedir. Yapılan çalışmalar probiyotik mikroorganizmaların lokal ve toplam immünoglobulin A (IgA) düzeyini etkileyerek konak canlının enfeksiyonlara karşı direncini arttırdığını ve *Lactobacillus salivarius* ve *Bifidobacterium breve*'nin yaşlılarda yardımcı T hücreleri (T-helper cell) tarafından oluşturulan antijene özgü immün yanıtı aktive ederek immün sistemin düzenlenmesinde rol oynadığını ve böylece bağışıklığı olumlu bir şekilde etkilediğini göstermiştir. İmmünoglobulin A, patojen mikroorganizmaların bağırsak mukozasına yapışmasını engellemede rol alan bir antikordur. Probiyotik bakteriler antijen özellikteki maddelerin kimyasal yapılarını değiştirerek veya vücuttan gayta ile atılmalarını sağlayarak dolaşım

sistemine geçişlerini engeller ve alerjik rahatsızlıkların görülme sıklığını azaltabilirler (Gibson 1998; Spanhaak *et al.* 1998; Molbay ve Çekin 1999; Rodrigues *et al.* 2000; Yılmaz 2004; Giamarellos-Bourboulis *et al.* 2009; Iemoli *et al.* 2012; Ceyhan ve Alıç 2012; Hao *et al.* 2015).

Laktobasil türleri, rota virüsü gibi ishal ile seyreden hastalıkların tedavisinde kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca probiyotik kullanımı sayesinde ishale yakalanma oranının 4 kat azaldığı görülmüştür. *Saccharomyces boulardii*'de ishal rahatsızlıklarında aynı etkiyi göstermiştir. *Lactobacillus salivarius* türünün, çeşitli mide ve bağırsak hastalıklarına sebep olan *Helicobacter pylori*'nin gelişimini durdurduğu birçok çalışmayla kanıtlanmıştır. Probiyotik mikroorganizmalar hem bu bakterinin epitele adezyonunu önler hemde sonrasında gelişen yan etkilerini azaltabilir. (Guarino *et al.* 1997; Aiba *et al.* 1998; Molbay ve Çekin 1999; Mukai *et al.* 2002; Jacobson 2015).

Probiyotik mikroorganizmalar laktozu parçalayabildikleri için laktoz seviyesinin düşmesine sebep olurlar ve böylece laktoz intoleransı olan hastalarda, bu rahatsızlığın ortadan kalkmasında önemli rol oynarlar. Lipid ve proteinlerin enzimatik hidrolizinde rol alarak bu bileşiklerin kullanılabilirliklerini artırır. Safra tuzlarının atılımını artırır. Kanda kolesterolün yükselmesi birçok rahatsızlığa neden olabilmektedir. Probiyotikler hem bağırsaktaki deoksikolik asit (DCA) seviyesini azaltarak kandaki kolesterol seviyesinin dengelenmesini sağlarlar hem de iyi huylu kolesterol (HDL, yüksek yoğunluklu lipoprotein) seviyesinin artmasını sağlarlar. Kalp ve damar rahatsızlıklarından korunmada etkindirler. Ayrıca bifidobakterler, laktik ve asetik asit gibi zayıf asitler üreterek bağırsak pH'ını dengelerler. Bu sayede bağırsağı ve doğal olarak konakçı canlıyı çeşitli hastalıklara karşı korurlar. (Savaiano 1984; Walker and Gilliland 1993; Kundakçı ve Ergönül 2006; Coşkun 2006; Guo *et al.* 2012).

Yenidoğan dönemde, bebeklerde görülen ve bir sindirim sistemi rahatsızlığı olan nekrotizan enterokolite, *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium infantis* katkılı mamalarla beslenen bebeklerde daha az rastlanmaktadır (Çetinkaya ve Köksal 2004).

Probiyotik mikroorganizmalar solunum yolu enfeksiyonları ile ilgili rahatsızlıkların daha kısa sürede ve daha az şiddetli atlatılmasında büyük rol oynar. *Lactobacillus plantarum* vücuda yeterli düzeyde alındığında, iltihaplı inflamatuvar rahatsızlıkların azalmasına ve yaraların daha hızlı iyileşmesine yardımcı olabilmektedir. Özellikle ameliyatlardan sonra, bu etkiler çok büyük fayda sağlamaktadır. Ayrıca probiyotik mikroorganizmalar anti-toksin mekanizmasına sahiptir. Bu sayede zararlı mikroorganizmaların oluşturduğu toksinlerin parçalanmasında rol alırlar (Hao *et al.* 2015; Anonim 2018; Gürkan 2018).

Çeşitli kanser türleri arasında kolorektal kanser (CRC) dünya genelinde ve özellikle gelişmiş ülkelerde çok sık görülen ve ölüm oranı yüksek olan bir kanser türüdür. Yapılan çalışmalar, intestinal mikrobiyotada yeterli miktarda probiyotik mikroorganizma olduğu zaman CRC gelişiminin önlenilebileceğini göstermiştir. Probiyotikler hem karsinogenik maddeleri inaktif hale getirebilirler hem de bunları salgılayan mikroorganizma enzimlerinin inhibisyonunu sağlarlar. Bu mikroorganizmalar konakçı bağırsak mikrobiyotasını düzenleyerek konakçıya sağlık yararı sağlamaktadırlar. Ayrıca antioksidan etkiye de sahiptirler (Sullivan and Nord 2002; Bassaganya-Riera *et al.* 2012; Mohania *et al.* 2013; Kıray ve Kariptaş 2015; Dos-Reis *et al.* 2016).

Probiyotik mikroorganizmaların kullanımı, karaciğer rahatsızlıklarının ve vajinal enfeksiyonların tedavisinde, ağız ve diş sağlığının korunmasında da yarar sağlamaktadır (Gürkan 2018).

Probiyotik mikroorganizmaların tüm bu yararlı etkileri sağlamasında mikroorganizmanın; tipi (tür, cins, suş), bulunduğu gıdadaki konsantrasyonu, ölü veya canlı oluşu ve ürettiği metabolitler büyük oranda etkili olmaktadır. Her probiyotik mikroorganizma türü kendine özgü farklı özelliklere sahiptir. Tüketildikleri zaman hepsi aynı etkiyi sağlamaz. Bu yüzden hangi hastalığa hangi probiyotik mikroorganizmanın daha iyi geleceği üzerine bilimsel araştırmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. Aynı zamanda çeşitli probiyotik mikroorganizmaların birlikte kullanılmasıyla

bağırsaklarda oluşan sinerjist etki de birçok yarar sağlayabilmektedir. Konakçının bağırsak mikroflorası ve prebiyotikler de probiyotiklerin beklenen yararı sağlamasında etkili olmaktadır. Prebiyotikler, sindirilmeden doğrudan kalın bağırsağa geçen karbonhidratlardır. Laktuloz, inülin ve galaktoz içeren galakto oligosakkaritler prebiyotik olan bu karbonhidratlara örnek olarak verilebilir. Bunlar bağırsakta bulunan probiyotikler tarafından kullanıldığı için probiyotiklerin gelişimini ve aktivitesini olumlu bir şekilde etkilemektedir. Prebiyotikler bağırsakta bulunan patojenlerin gelişimini ise engellemektedir (Crittenden 2001; İnanç vd 2005; Harman and Knol 2006; Tannis 2008; Shenderov 2011; Sezen 2013; Kıray ve Kariptaş 2015).

Probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmalar hakkında giderek artan araştırmalar ve çalışmalar sayesinde ilerleyen dönemlerde birçok hastalığı önleyebilecek ve tedavi edebilecek mikroorganizma suşları bulunabilecektir (Gürkan 2018).

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

Özellikle modern zamanda sağlıklı beslenme konusunda insanların daha çok bilinçli hale gelmesiyle birlikte, probiyotikler büyük önem kazanmıştır. Bu amaçla çeşitli gıdalardan izole edilen mikroorganizmaların probiyotik ve teknolojik özelliklerinin ve gastrointestinal sistemdeki tutumlarının belirlenmesi amacıyla bilim insanlarınca birçok çalışma yapılmıştır.

Uroic *et al.* (2014) tarafından Hırvatistan ve Sırbistan'dan geleneksel olarak üretilmiş salamura beyaz peynir örnekleri toplanarak LAB'ların izolasyonu ve ilgili izolatların bazı probiyotik özelliklerinin incelenmesi gerçekleştirilmiştir. Peynirlerden, toplamda 86 adet LAB izole edilmiştir. Elde edilen LAB izolatlarının gastrointestinal sistem koşullarına dayanıklılıklarını belirlemek amacıyla simüle mide ve safra ortamı hazırlanarak mikroorganizmalara uygulanmıştır. Bu işlem sonucunda 86 izolatın sadece 26 tanesi sindirim sistemi koşullarına direnç gösterebilmiştir. Daha sonra en iyi direnç gösteren 11 suşun *in vitro* koşullarda Caco-2 ve HT29-MTX bağırsak adenokarsinoma hücrelerine tutunma özellikleri test edilmiştir. Suşlar Caco-2 hücrelerine çok iyi bir şekilde tutunurken, HT29-MTX hücrelerine çok iyi tutunum gösterememişlerdir. Çalışma sonucunda bu suşların probiyotik süt ürünlerinin ticari üretiminde potansiyel probiyotik olarak kullanılabilecekleri görülmüştür.

Samanje (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, farklı bölgelerden 50 adet süt örneği toplanmış ve izolasyon işlemi uygulanarak toplam 103 laktobasil suşu elde edilmiştir. Elde edilen izolatların fenotipik karakterleri incelendikten sonra suşlar, probiyotik özellikleri açısından da değerlendirilmiştir. Bu amaçla suşların mide koşullarına ve yüksek safra konsantrasyonuna dirençleri incelenerek sonraki analizler için 14 uygun suş seçilmiştir. Daha sonra seçilen suşların antibiyotik dirençleri ve antimikrobiyal özellikleri incelenmiş ve bu LAB'ların bağırsak epitel hücrelerine tutunumunu belirlemek amacıyla *in vitro* analizlere geçilmiştir. Tutunum testi için HT-29 hücre hattı kullanılmıştır. Analizlerin sonucunda; 14 izolatın hepsinin antimikrobiyal etkiye sahip olduğu, 9 suşun probiyotik özelliklerinin çok iyi olduğu ve içlerinden 2 tanesinin ise

HT-29 hücrelerine iyi bir şekilde bağlandığı görülmüştür. Probiyotik özellikleri çok iyi olan 9 suşun moleküler tanı sonucunda *L. plantarum* olduğu tespit edilmiştir.

Urla Bölgesinden doğal yoğurt örneği toplanarak LAB'ların izolasyon ve karakterizasyonlarının yapılması ile probiyotik özelliklerinin incelenmesinin amaçlandığı çalışma Okuklu (2014) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda bölgeden 13 farklı yoğurt örneği toplanmış ve öncelikle izolasyon işlemi yapılarak 473 adet LAB suşu elde edilmiştir. Suşlara, fizyolojik ve biyokimyasal metotlar ile probiyotik özellikler kullanılarak tanılama işlemi yapılmış, 26 basil ve 5 kok muhtemel probiyotik olarak belirlenmiştir. PCR-RFLP ve PFGE-RFLP metotlarına başvurularda muhtemel probiyotik suşlar için daha ileri seviyede bir karakterizasyon işlemine gidilmiştir. Mide asidine direnç, safra tuzuna karşı tolerans, kolesterol asimilasyonu, gastrointestinal sistemden geçiş ve Caco-2 epitel hücrelerine yapışma kabiliyeti, antibiyotik direnci, hücre yüzey hidrofobikliği ve antimikrobiyal aktivite testleri uygulanarak suşların probiyotik özellikleri incelenmiştir. Sonuç olarak suşların hepsinin aside ve safra tuzuna dayanıklı olduğu, Caco-2 epitel hücrelerine yapışabildikleri ve *Escherichia coli* ve *Listeria innocua* üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir.

Pisano *et al* (2014) süt ürünlerinden izole edilen laktobasillerin, probiyotik olarak kullanılabilirliklerini belirlemeyi amaçlayan bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu kapsamda, süt ürünlerinden toplam 23 adet *Lactobacillus* suşu izole edilerek bazı özellikleri incelenmiştir. Öncelikle izole edilen suşların, patojen mikroorganizmaları inhibe edebilme yetenekleri ve safra tuzlarına karşı toleransları incelenmiştir. Daha sonra en iyi özelliği gösteren 6 suş; gastrointestinal sistemde hayatta kalma, bağırsak epitel hücrelerine tutunma, enzimatik aktivite ve bazı güvenlik özellikleri açısından değerlendirilmiştir. Bütün suşlar simüle gastrointestinal sistem koşullarında hayatta kalmayı başarmıştır. *Lactobacillus rhamnosus* suşu, Caco-2 bağırsak hücrelerine diğer suşlardan daha yüksek oranlarda (%20) tutunum göstermiştir. Tüm suşların yüksek aminopeptidaz ve beta-galaktosidaz aktivitesi gösterirken, düşük proteolitik aktivite

gösterdikleri ve birçok antibiyotiğe karşı duyarlı oldukları gözlemlenmiştir. Bu çalışma sonucunda LAB suşlarının potansiyel probiyotik adayı oldukları belirlenmiştir.

Ticari olarak kullanılan ve muhtemel probiyotik olan bazı LAB'ların birtakım probiyotik özelliklerinin incelenmesinin amaçlandığı çalışma Jensen *et al.* (2011) tarafından yapılmıştır. *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri* ve *Pediococcus pentosaceus* suşlarının insan gastrointestinal sisteme toleransı ve insan kolon adenokarsinoma hücre hatlarına (Caco-2, HT-29 ve LS 174T) tutunumu *in vitro* koşullarda incelenmiştir. *L. reuteri* ve *P. pentosaceus* suşlarının insan mide ve safra koşullarına çok iyi dayandığı, *L. pentosus*, *L. farciminis* ve *L. sakei* suşlarının ise 180 dakika sonunda canlılıklarını kaybettiği gözlemlenmiştir. *L. plantarum* MF1298 ve üç *L. reuteri* suşunun uygulanan hücre hatlarına güçlü bir şekilde tutunduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak *L. reuteri* suşları diğerleriyle kıyaslandığında daha üstün probiyotik özelliklere sahip olduğu görülmüştür.

Kimoto *et al.* (1999) tarafından yapılan çalışmada, farklı ülkelerin kültür koleksiyonundan toplanan ve probiyotik oldukları bilinen 9 *Lactococcus* suşunun Caco-2 hücrelerine tutunumu, asidik koşullara (pH 2,5) direnci ve safra tuzuna (%0,5-%0,9) karşı toleransları test edilmiştir. Bu çalışmada *Lactobacillus johnsonii* La1 pozitif kontrol, *L. acidophilus* JCM 1132 ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Suşların, düşük pH ve safra uygulamasından sonra canlılığını belirlemek için MRS agar üzerinde sayım yapılmıştır. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* NIAI527 suşunun aside ve safraya en dayanıklı suş olduğu tespit edilmiştir. Bağırsak epiteline tutunumu belirlemek amacıyla Caco-2 hücreleriyle yapılan analizin sonucunda ise 6 suşun bu hücrelere bağlanabildiği ancak *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* NIAI527 suşunun en yüksek oranda bağlanma gösterdiği belirlenmiştir.

*Dongchimi*, *kimchi*, *meju* gibi Kore'ye ait geleneksel fermente gıdalardan izole edilen LAB'ların bazı probiyotik özelliklerinin belirlenmesinin amaçlandığı çalışma Lim and Im (2009) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda LAB suşları; asit ve safraya

tolerans, antibiyotik direnci, Caco-2 ve HT-29 hücrelerine tutunma kapasitesi ve patojenlere karşı inhibisyon açısından bazı testlere tabi tutulmuştur. Testler sonucunda DC 55, DC 136, DC 222, KC 21, KC 24, KC 34, KC 43, KC 117, MJ 54, MJ 301, SP 33 ve SP 170 suşlarının asit ve safra tuzuna karşı çok iyi direnç gösterdikleri görülmüştür. DC 55, DC 136, KC 24, KC 43 ve MJ 301 suşları 20 mg/ml ve üzeri konsantrasyonlarda bulunan vankomisin, streptomisin sülfat ve amoksisilin antibiyotiklerine karşı dirençliken, DC 222, KC 21, KC 34, KC 117, MJ 54 ve SP 33 suşları 2 mg/ml'nin altındaki konsantrasyona direnç gösterebilmiştir. DC 55, KC 21, KC 24 ve MJ 301 suşları Caco-2 ve HT-29 hücrelerine %50'den daha yüksek bir oranda tutunum göstermiştir. Ayrıca KC 21 suşu, *Staphylococcus aureus* üzerine yaklaşık %70 oranında inhibisyon gerçekleştirmiştir. Bu etkiyi hem organik asit hem de bakteriyosin üretimi ile sağlamıştır. Fenotipik özelliklerin belirlenmesi ve çeşitli şekerlerin kullanımına dayanan tanılama ile KC 21 suşunun *Lactobacillus plantarum* olduğu tespit edilmiştir.

Duary *et al.* (2011) tarafından yapılan çalışmada; insan bağırsağından, bizon sütünden ve peynirden izole edilen *Lactobacillus plantarum*, ve *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CH4 izolatlarının Caco-2 ve HT-29 hücrelerine tutunumu *in vitro* koşullarda hücre kültürü metoduyla incelenmiştir. *L. plantarum* CSCC5276 ise referans kültür olarak çalışmada yer almıştır. Çalışma sonucunda insandan izole edilen *L. plantarum* Lp72, *L. plantarum* Lp75, *L. plantarum* Lp77, *L. plantarum* Lp90, *L. plantarum* Lp91 ile bizon sütü ve peynirden izole edilen *L. plantarum* Lp9, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* CH4 kültürlerinin hepsinin Caco-2 ve HT-29 hücrelerine tutunduğu gözlenmiştir. Ancak suşlar yüzde tutunum oranları açısından kıyaslandığında referans kültürde dahil olmak üzere *L. plantarum* Lp91'in en etkili kültür olduğu tespit edilmiştir.

Tuomola and Salminen (1998) tarafından yapılan çalışmada, çoğu gıda endüstrisinde probiyotik olarak kullanılan 12 farklı *Lactobacillus* suşunun bağırsak epiteline tutunumu belirlemek amacıyla hücre kültürü metodu kullanılarak suşların Caco-2 hücrelerine tutunumu test edilmiştir. *Escherichia coli* suşları ise pozitif ve negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Caco-2 hücre hattına en iyi tutunan suş *L. casei* (%14)

olurken, en az tutunum gösteren suşun *L. casei* var. *Rhamnosus* (%3) olduğu görülmüştür. Pozitif kontrol suşu %14 oranında tutunum gösterirken, negatif kontrol ise %3 oranında bir tutunum göstermiştir. Ayrıca *L. acidophilus* 1 (LC1Ö), *L. rhamnosus* LC-705 ve *Lactobacillus* GG (ATCC 53103) suşlarının da kontrol suşu ile kıyaslandığında Caco-2 hücrelerine iyi bir şekilde tutunduğu gözlemlenmiştir.

*Lactobacillus rhamnosus* DR20, *L. acidophilus* HN017, ve *Bifidobacterium lactis* DR10 suşlarının *in vitro* koşullarda bağırsak epitel hücrelerine tutunumunun, kolonizasyon özelliklerinin ve enterotoksijenik *Escherichia coli*'ye karşı antagonistik aktivitelerinin incelenmesini amaçlayan çalışma Gopal *et al.* (2001) tarafından yapılmıştır. Bu çalışma kapsamında, HT-29, Caco-2, ve HT29-MTX insan intestinal hücre hatları kullanılmıştır. *L. acidophilus* LA-1 ve *L. rhamnosus* GG suşları kontrol suş olarak kullanılmıştır. Tutunan suşların sayısı, gram boyama sonrası mikroskop altında sayım ve radyoaktif-işaretleli bakterilerin sinitilasyon sayımı olmak üzere iki farklı yolla gerçekleştirilmiştir. Üç suşta intestinal hücre hattına bağlı olarak değişen oranlarda güçlü bir bağlanma göstermiştir. Mukus salgılayan HT29-MTX hücre hattına suşların iki-üç kat daha fazla oranda bağlandığı gözlemlenmiştir. Daha sonra yapışan suşların bağırsakta tek tabaka halinde bulunan ve toksik olduğu bilinen *E. coli* O157:H7'ye karşı inhibe edici etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak bu suşların *E. coli* O157:H7 sayısında azalmaya neden olduğu görülmüştür.

Alp (2018) tarafından yapılan çalışmada, çeşitli illerden toplanan gıda ve bitkilerden 69 adet LAB izole edilmiştir. İzole edilen bu bakterilerin probiyotik özelliklerini belirlemek için; mide ortamına dirençleri, safra tuzlarına karşı gösterdikleri tolerans, kolesterol seviyesini düşürme yetenekleri, ekzopolisakkarit üretilip üretilmedikleri ve çeşitli patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal özellikleri belirlenmiştir. Daha sonra seçilen LAB'lara *in vitro* koşullarda bağırsak epiteline tutunum ve patojenlerin bağırsağa yapışmasını engelleme yetenekleri incelenmiştir. Başta *Lactobacillus plantarum* olmak üzere 9 suşun ekzopolisakkarit ürettiği ve en fazla kolesterol asimilasyonunu ise *Leuconostoc lactis*'in yaptığı tespit edilmiştir. İzolatlar, bağırsak epiteline iyi bir şekilde tutunum göstermiştir. Ayrıca izolatların *Listeria monocytogenes*

gibi bazı patojenlere karşı oldukça yüksek oranda epitel hücrelere tutunma kapasitesi olduğu görülmüştür.

Probiyotik olan *Enterococcus mundtii* ST4SA ve *Lactobacillus plantarum* suşlarının bazı patojenlerin epitel hücrelere tutunumunu engelleme yeteneğini ve antibiyotik ile antienflamatuar ilaçların varlığında Caco-2 hücrelerine tutunumunu inceleyen çalışma Botes *et al.* (2009) tarafından gerçekleştirilmiştir. *In vitro* koşullarda Caco-2 hücre hattı kullanılarak yapılan çalışma sonucunda, her iki suşun da (*L. casei* MB1, *L. casei* Shirota, *L. johnsonii* La1 and *L. rhamnosus* GG ile kıyaslandığında) Caco-2 hücrelerine iyi bir şekilde tutunduğu görülmüştür. Ancak aynı işlemler antibiyotik maddeler ve antienflamatuar ilaçların varlığında yapıldığında tutunumun büyük oranda azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu iki suşun *Listeria monocytogenes* ScottA'nın Caco-2 hücrelerine tutunumunu engellemediği görülmüştür.

Schillinger *et al.* (2005) tarafından yapılan çalışmada, Almanya'da bazı marketlerden ve üreticilerden toplanan probiyotik yoğurt gibi süt ürünlerinden izole edilen LAB'ların birtakım probiyotik özelliklerinin ve *in vitro* koşullarda bağırsak epiteline tutunumlarının (mukus salgılayan HT29-MTX hücre hattı kullanılarak) incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda *in vitro* sistemde simüle mide ortamı (pH 2,0) ve safra tuzları kullanılarak *Lactobacillus acidophilus* grubu ile *L. casei*'nin 9 suşu kıyaslanmıştır. Kıyaslama sonucunda *L. acidophilus* grubuna ait suşların *L. paracasei* ve *L. rhamnosus* suşlarına göre mide ortamına daha dayanıklı olduğu gözlenmiştir. Ayrıca *L. acidophilus*'un test edilen bütün suşları safra tuzlarını tolere edebilmiştir. HT29-MTX hücrelerine bağlanma testinde ise *L. rhamnosus* GG. suşu referans olarak kullanılmış ve tüm LAB suşlarının yüksek oranlarda (%20-40) HT29-MTX hücrelerine tutunduğu belirlenmiştir. Ancak *Lactobacillus* BFE 704 suşunun diğerlerinden daha yüksek oranda tutunduğu tespit edilmiştir.

Anne sütü ve anne sütüyle beslenen bir bebeğin dışkılarından izole edilen *Lactobacillus salivarius* CECT 5713 suşunun bazı probiyotik özelliklerinin incelenmesini amaçlayan çalışma Martín *et al.* (2006) tarafından yapılmıştır. Öncelikle bebek dışkılarından izole

edilen bu suşun, RAPD ve PFGE analizleri yapılarak bebeğin beslendiği annenin sütünde de bulunduğu tespit edilmiştir. Daha sonra *Lactobacillus salivarius* CECT 5713 suşu; antimikrobiyal madde üretebilme, simüle gastrointestinal sistemde canlı kalabilme ve intestinal hücrelere tutunabilme yeteneklerinin belirlenmesi amacı ile test edilmiştir. Suşun; laktat, asetat, hidrojen peroksit ve bakteriyosin üreterek kullanılan indikatör organizmalara karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve gastrointestinal sistemde büyük oranda (%55) hayatta kaldığı görülmüştür. Ayrıca *Lactobacillus salivarius* CECT 5713 suşunun Caco-2 ve HT-29 hücrelerine güçlü bir şekilde bağlandığı tespit edilmiştir.

Verdenelli *et al.* (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, yaşları 60-90 arasında değişen insanların dışkılarından izole edilen *Lactobacillus rhamnosus* ve *Lactobacillus paracasei* suşları probiyotik açıdan incelenmiştir. İzole edilen 11 adet laktobasil suşunun; morfolojik, kültürel ve fizyolojik özellikleri analiz edilmiştir. Suşların sindirim sisteminde canlılıklarını devam ettirebilme durumlarını belirlemek amacıyla, *in vitro* koşullarda mide (pH 3) ve safra tuzuna tolerans (%0,1; 0,3; 0,5) testleri yapılmıştır. Daha sonra, HT-29 hücrelerine yapışma, antimikrobiyal aktivite ve antibiyotik duyarlılık incelenmiştir. Analizler sonucunda; *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 ve *Lactobacillus paracasei* IMC 502 suşlarının düşük asidik ortam ve safra koşullarını iyi bir şekilde tolere ettiği; *E. coli* ATCC 11775, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *Candida albicans* ATCC 10261 ve *Streptococcus mutans* ATCC 20523'e karşı inhibitör etki sergiledikleri; vancomisin, kolistin sülfat, gentamisin, oksolinik asit ve kanamisine karşı dirençli oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca bu iki suş HT-29 hücrelerine güçlü bir tutunum göstermiştir. Sonuç olarak *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 ve *Lactobacillus paracasei* IMC 502 suşlarının muhtemel probiyotik olduğu görülmüştür.

Ülkemizin çeşitli bölgelerinden kefir örnekleri toplanarak yapılan bir çalışmada izolasyon işlemi yapılmış ve elde edilen izolatlar moleküler tanılama işlemi uygulanarak *Lactobacillus acidophilus* türüne ait dört suş elde edilmiştir. Tanılama amacıyla bakteri genlerinin 16S rRNA bölgeleri PCR ile çoğaltılmıştır. Elde edilen bu

suşlara, mide asidi ve safra tuzlarına direnç testi, antibiyotik duyarlılık testi ve hidrofobisite testi yapılarak probiyotik karakterleri incelenmiştir. Yapılan bu *in vitro* analizler sonucunda bütün izolatların mide ortamına ve safraya karşı oldukça dayanıklı olduğu, ancak suşların hücre yüzeyi hidrofobisitesinin oldukça düşük olduğu görülmüştür. Test sonuçlarına göre kefirlerden elde edilen laktobasillerin muhtemel probiyotik suş olabileceğine karar verilmiştir (Günel 2014).

Yenidoğan bebekler için büyük öneme sahip olan anne sütünün probiyotik açıdan incelenmesinin amaçlandığı çalışma, Yavuzdurmaz (2007) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında, 15 sağlıklı anneden süt örnekleri toplanmıştır ve farklı besiyerlerinde anaerobik koşullarda izolasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sonucunda 200 adet laktik asit bakterisi izole edilmiştir. Daha sonra probiyotik özelliklerini gözlemlemek amacıyla suşların; asidik koşullara (pH 3) direnci, safra tuzlarına (%0,3) toleransı ve antimikrobiyal aktivitesi test edilmiştir. İzolatların sadece üçü (iki adet basil, bir adet kok) hem mide hem de safraya karşı yüksek oranda direnç göstermiştir. Ayrıca *Salmonella thyphimurium* CCM 5445, *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 129000 ve *Escherichia coli* NRRL B-3008 mikroorganizmaları üzerine antibakteriyel etki gösterdikleri tespit edilmiştir. Daha sonra bu üç suşun 16S rRNA bölgeleri PCR ile çoğaltılmış ve RFLP'leri (Restriction Fragment Length Polymorphism) ile kıyaslanarak bu suşlar *Lactobacillus oris* ve *Lactobacillus fermentum* şeklinde tanımlanmıştır. Sonuç olarak bu suşların potansiyel probiyotik olarak kullanılabileceği görülmüştür.

Aakef (2018) tarafından yapılan çalışmada, Libya, Irak ve Türkiye'den 16 adet hurma çeşidi toplanmıştır. Bu hurmalardan 16 maya suşu izole edilmiş ve yapılan moleküler tanı ile suşların *Pichia kudriavzevii* ve *Kluyveromyces marxianus* olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra bu suşların; pH 2'de aside karşı dirençleri, %0,3 oranında safraya karşı toleransları, hücre yüzeyi hidrofobiklikleri, agregasyon kapasiteleri, antimikrobiyal karakterleri ve antibiyotik dirençleri çeşitli testlerle belirlenmiştir. Suşların *L. acidophilus* ve *P. auroginosa* üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip oldukları ancak *C. albicans* için hiçbir inhibe edici etkilerinin olmadığı ve bazılarının çeşitli

antibiyotiklere karşı dirençli oldukları gözlemlenmiştir. Çalışma sonucunda *P. kudriavzeii*'nin *K.marxianus* suşuna göre daha iyi probiyotik özelliklere sahip olduğu anlaşılmıştır.

Yapılan çalışmayla bölümümüz kültür koleksiyonunda bulunan farklı turşu örneklerinden izole edilmiş ve tanıları gerçekleştirilmiş laktik asit bakterileri önemli bazı probiyotik testler kullanılarak incelenmiştir. İzolatların ön probiyotik özelliklerinin değerlendirilmesi amacıyla mide ortamı ve safra tuzlarına direnç, bağırsak hücrelerine tutunum testleri gerçekleştirilmiştir. Böylece probiyotik özelliğe sahip fonksiyonel gıda üretiminde kullanılabilecek muhtemel probiyotik suşlar belirlenmiştir. Ayrıca izolatların farklı sıcaklıklarda gelişim özellikleri de incelenmiştir. Gerçekleştirilen çalışma muhtemel probiyotik suşların tespitinde bağırsak hücrelerine tutunum özelliklerinin incelenmesi açısından ülkemizde ilk çalışmalardan birisini oluşturmaktadır.

### 3. MATERİYAL ve METOD

#### 3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan laktik asit bakteri suşları Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarından temin edilmiştir. İlgili bakteriler önceki çalışmalar kapsamında geleneksel olarak üretilmiş turşu örneklerinden izole edilerek moleküler metodlarla tanıları gerçekleştirilmiş suşlardan oluşturulmuştur. Denemede toplam 94 adet laktik asit bakterisi suşu kullanılmış olup, depolandıkları -80 dereceden çıkarılarak ilgili besiyerine (MRS ve M17 agar) üçlü çizim usulü ekimleri gerçekleştirilmiş, makroskobik ve mikroskobik yöntemlerle saflıkları incelenmiştir. Çalışmada kullanılan laktik asit bakterilerinin tür ve numaraları Çizelge 3.1’de sunulmuştur.

**Çizelge 3.1.** Çalışmada kullanılan turşu orijinli laktik asit bakterileri

| Suş Numarası | Türü                             | Suş Numarası | Türü                           |
|--------------|----------------------------------|--------------|--------------------------------|
| RN23         | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | RN148        | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN49         | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | RN149        | <i>Lactobacillus paracasei</i> |
| RN57         | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | RN151        | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN59         | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | RN152        | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN60         | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | RN153        | <i>Leuconostoc holzapfelii</i> |
| RN61         | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | RN154        | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN62         | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | RN155        | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN63         | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | RN156        | <i>Lactobacillus plantarum</i> |

Çizelge 3.1. (devam)

|       |                                  |       |                                |
|-------|----------------------------------|-------|--------------------------------|
| RN64  | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | RN157 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN101 | <i>Lactobacillus plantarum</i>   | RN159 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN103 | <i>Lactobacillus plantarum</i>   | RN160 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN104 | <i>Lactobacillus plantarum</i>   | RN161 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN105 | <i>Lactobacillus plantarum</i>   | RN162 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN106 | <i>Lactobacillus plantarum</i>   | RN163 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN107 | <i>Lactobacillus plantarum</i>   | RN164 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN109 | <i>Lactobacillus plantarum</i>   | RN166 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN110 | <i>Lactobacillus plantarum</i>   | RN167 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN111 | <i>Lactobacillus plantarum</i>   | RN168 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN112 | <i>Lactobacillus plantarum</i>   | RN169 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN113 | <i>Lactobacillus plantarum</i>   | RN170 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN114 | <i>Lactobacillus plantarum</i>   | RN171 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN115 | <i>Lactobacillus plantarum</i>   | RN172 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN116 | <i>Lactobacillus plantarum</i>   | RN173 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN117 | <i>Lactobacillus plantarum</i>   | RN174 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN119 | <i>Lactobacillus paracasei</i>   | RN175 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN120 | <i>Lactobacillus plantarum</i>   | RN176 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |

Çizelge 3.1. (devam)

|       |                                |       |                                |
|-------|--------------------------------|-------|--------------------------------|
| RN121 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | RN177 | <i>Lactobacillus paracasei</i> |
| RN122 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | RN178 | <i>Lactobacillus paracasei</i> |
| RN123 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | RN179 | <i>Lactobacillus paracasei</i> |
| RN124 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | RN180 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN125 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | RN182 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN126 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | RN183 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN129 | <i>Pediococcus parvulus</i>    | RN184 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN130 | <i>Pediococcus parvulus</i>    | RN185 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN133 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | RN186 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN135 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | RN187 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN136 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | RN188 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN138 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | RN189 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN139 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | RN190 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN140 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | RN191 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN141 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | RN192 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN142 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | RN193 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN143 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | RN194 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN144 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | RN195 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |

**Çizelge 3.1. (devam)**

|       |                                |       |                                |
|-------|--------------------------------|-------|--------------------------------|
| RN145 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | RN196 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN146 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | RN199 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| RN147 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | RN200 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |

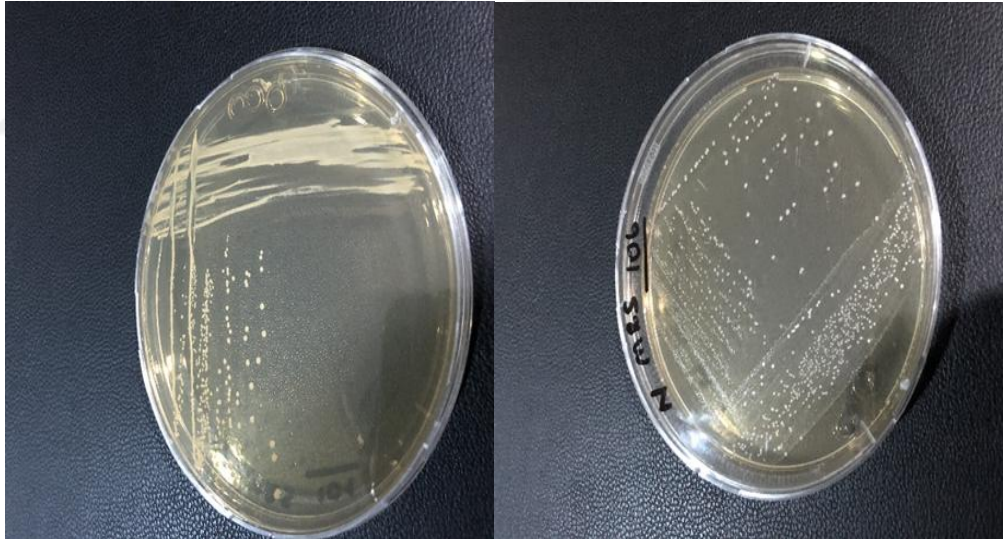
Çalışmada kullanılan suşların bağırsak epiteline tutunum yeteneğinin belirlenmesi amacıyla HCT-116 (ATCC CCL-247) ve HT-29 (ATCC HTB-38) kolon kanseri hücre hatları kullanılmıştır. Hücre kültürü hatları Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilimdalı laboratuvarlarından temin edilmiştir. Çalışmanın mikrobiyolojik deneyleri Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında, doku kültürü deneyleri ise Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilimdalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

### 3.2. Metod

Çalışmada öncelikle turşu örneklerinden izole edilerek derin dondurucuda (-80°C) muhafaza edilen suşlar tekrar canlandırılarak mikroskopik, makroskopik ve bazı kültürel özellikleri (gram boyama ve katalaz) incelenmiştir. İlgili suşlar kültürel özelliklerinin teyidi ve saflık kontrollerinin ardından probiyotik özelliklerinin incelenmesi amacı ile gastrointestinal sisteme dayanım (mide ve safra) açısından test edilmişlerdir. Sindirim sistemine en üst düzeyde dayanım gösteren iki suş kolon hücrelerine tutunum özelliklerinin belirlenmesi amacı ile HCT-116 (Human colon carcinoma) ve HT-29 (Homo sapiens colon colorectal adenocarcinoma) hatları kullanılarak hücre kültürü testine tabi tutulmuştur. Böylece mevcut suşlar önemli görülen ön probiyotiklik özellikler için test edilmişlerdir. Ayrıca turşu kaynaklı isolatların ürün kullanımında önemli bir karakteristiği olan farklı sıcaklıklarda gelişim özellikleri de belirlenmiştir.

### 3.2.1. Mikrobiyolojik deneyler

Denemede kullanılan ve donmuş kültür olarak muhafaza edilen laktobasiller ve laktokoklar, ilgili deneylerin yapılması amacıyla  $-80^{\circ}\text{C}$ ' den çıkarılarak MRS (Merck) ve M17 (Merck) agarlara steril öze ile çizilmiştir. Çizimi gerçekleştirilen petriler  $32^{\circ}\text{C}$ 'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda makroskobik ve mikroskobik olarak saflıkları kontrol edilen suşlar kullanılmıştır. İlgili denemelerde kullanılacak laktik suşlar öze yardımı ile steril fizyolojik tuzlu (%0,85 NaCl, Merck) su ortamına alınmış ve hücre süspansiyonlarının yoğunlukları densitometre (BioSan DEN-1 McFarland Densitometer) yardımı ile Mc Farland 0,5'e ayarlanmıştır. Şekil 3.1'de  $-80^{\circ}\text{C}$ ' den çıkarılarak canlandırmak amacıyla çizimi yapılan ve inkübe edilen suşlardan iki tanesi gösterilmiştir.



**Şekil 3.1.** Canlandırma işlemi için çizimi yapılan suşlar

#### 3.2.1.a. Turşu izolatlarının bazı kültürel özelliklerinin incelenmesi

$-80^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılan turşu izolatları uygun besiyerine ekilip canlandırma işlemi yapıldıktan sonra, aşağıdaki analizlere tabi tutularak bazı kültürel özellikleri ve saflıkları teyit edilmiştir.

### **Gram boyama**

Gram boyama, bakteri suşlarının gram özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Lam üzerine alınan kültürler alev ile fikse edilerek sabitlenmiş daha sonra boyama işlemine geçilmiştir. Kültürler önce kristal viyole (1 dakika) daha sonra karbol füksin (30 saniye) ile boyanarak yıkama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Boyama işleminin ardından 40X objektif ile ışık mikroskobu altında inceleme yapılmış ve kristal viyole renkli koloniler gram pozitif, füksin renginde gözlenen koloniler ise gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Sert 2011).

### **Katalaz testi**

Katalaz enzimi birçok mikroorganizma tarafından üretilen ve hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ), su ve oksijene parçalayan bir enzimdir. Katalaz testi Temiz (2016)'e göre yapılmıştır. Saf olarak elde edilen kolonilerden lam üzerine öze yardımıyla alınmıştır ve saf su ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Üzerlerine %3'lük  $H_2O_2$  (Merck) çözeltisi damlatılmıştır. Damlatma işleminden sonra gözlenen gaz çıkışı pozitif olarak değerlendirilmiştir.

### **Basit boyama**

Lam üzerine hazırlanan preparat karbol füksin ile boyanıp 3 dakika bekletilerek su ile yıkanmıştır. Kurutma kâğıdı ile iyice kurulandıktan sonra mikroskob yardımıyla incelenmiştir (Sert 2011).

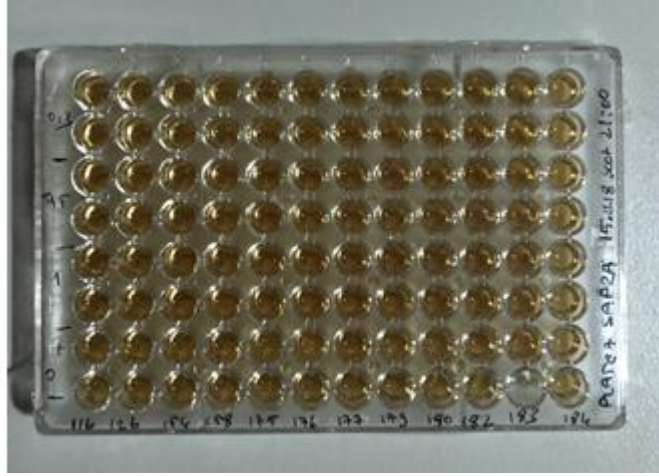
#### **3.2.1.b. Mide ortamında gelişimin incelenmesi**

Turşu kökenli laktik asit bakterilerinin mide ortamını geçerek ince bağırsağa ulaşabilme yeteneklerinin incelenmesi için mide simülasyon çözeltileri hazırlanmıştır. Bu amaçla %0,3 (w/v) pepsin ve %0,5 (w/v) NaCl kullanılmış olup, çözeltinin pH'sı HCl ile 2'ye ayarlanmış ve 0,45 µm çaplı filtreden geçirilip steril edildikten sonra kullanılmıştır.

Hazırlanan çözeltiliye bakteri konsantrasyonu  $10^8$  kob/mL olacak şekilde McFarland 0,5'e ayarlı bakteri süspansiyonundan ilave edilmiş ve 37°C'de 6 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından çözeltiden dilüsyonlar hazırlanarak ilgili besiyerlerine (MRS ve M17 agar) ekim yapılmıştır. Sayım sonucunda bakteri suşlarının mideyi geçebilme özellikleri % olarak belirlenmiştir. Deney sonucunda; mide ortamında %20-30 gelişim gösteren bakteri suşları +, %40-49 arasında gelişim gösterenler ++, %50-60 arasında gelişim gösterenler +++, hiç üremeyen suşlar ise – ile gösterilmiştir (Elcioglu and Kunduhoglu 2014).

### **3.2.1.c. Safra tuzlarına direncin belirlenmesi**

Gastrointestinal sistemde bulunan ve yağların sindiriminde rol alan safra tuzları mikroorganizmaların gelişimini etkileyen bir diğer önemli faktördür. Dolayısıyla suşların probiyotik özelliklerinin belirlenmesinde safra tuzlarına direnç testi de yapılmıştır. Bu amaçla suşların safra tuzlarına toleransının belirlenmesi için %0; %0,3; %0,5 ve %1'lik safra (Merck) içeren ilgili besiyerleri (MRS ve M17 broth, Merck) kullanılmıştır. İnkübasyon 96'lık platelerde gerçekleştirilerek çalışma minyatürize edilmiştir. Okumalar Mikroplate Reader'da (Epoch, BioTek) 37°C'de 48 saatlik inkübasyon boyunca belirli aralıklarla yapılmış ve absorbans değerlerine göre suşların safra tuzlarına toleransı belirlenmiştir. Deney sonucunda; <1 absorbans veren suşlar +, 1 ve 1,5 arasında absorbans verenler ++, >1,5 absorbans verenler +++, kör ile aynı absorbansı veren suşlar ise - ile gösterilmiştir. Safra tuzlarına direncin belirlenmesinde kullanılan 96'lık plate şekil 3.2' de verilmiştir. Şekil 3.3'de ise plate okumaya ait excel dosyası gösterilmiştir (Zago *et al.* 2011; Elcioglu and Kunduhoglu 2014).



Şekil 3.2. Safra tuzlarına dayanıklılık testinde kullanılan 96'lık plate

|                            | A                                                          | B     | C     | D     | E     | F     | G     | H     | I     | J     | K     | L     | M | N | O | P | Q | R | S | T | U | V | W | X |
|----------------------------|------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Software Version           | 02.09.2001                                                 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Experiment File Path       | C:\Users\Public\Documents\Protocols\600 nm plate okuma.pr1 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Protocol File Path         | C:\Users\Public\Documents\Protocols\600 nm plate okuma.pr1 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Plate Number               | 08 11 2018                                                 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Date                       | 11.02.01                                                   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Time                       | Epoch                                                      |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Reader Type                | 15101314                                                   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Reader Serial Number       | Reader                                                     |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Reading Type               | 96 WELL PLATE                                              |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Procedure Details          | 96 WELL PLATE                                              |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Plate Type                 | 96 WELL PLATE                                              |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Effect plate on completion | Absorbance Endpoint                                        |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Read                       | Full Plate                                                 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Wavelengths                | 600                                                        |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Read Speed                 | Normal                                                     |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Delay                      | 100 msec                                                   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Measurements Data Point    | 8                                                          |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Results                    | Actual Temperature: 0                                      |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|                            | 1                                                          | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| A                          | 1.121                                                      | 1.06  | 1.069 | 1.105 | 1.111 | 1.103 | 1.101 | 1.106 | 1.107 | 1.104 | 1.106 | 1.107 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| B                          | 0.969                                                      | 1.071 | 1.055 | 0.91  | 0.946 | 1.038 | 1.103 | 1.247 | 0.253 | 1.212 | 1.12  | 1.076 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| C                          | 0.88                                                       | 0.761 | 0.814 | 0.812 | 1.111 | 1.07  | 1.12  | 0.851 | 0.872 | 0.917 | 0.837 | 0.806 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| D                          | 0.97                                                       | 0.868 | 0.963 | 0.799 | 1.144 | 0.812 | 1.144 | 0.886 | 0.874 | 0.911 | 0.879 | 1.032 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| E                          | 0.489                                                      | 0.274 | 0.611 | 0.503 | 1.053 | 0.803 | 0.846 | 0.501 | 0.543 | 0.763 | 0.499 | 0.803 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| F                          | 3.5                                                        | 0.523 | 0.477 | 0.506 | 1.053 | 0.908 | 0.796 | 0.697 | 0.806 | 0.716 | 0.609 | 0.816 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| G                          | 1.477                                                      | 0.945 | 1.007 | 1.026 | 0.719 | 0.704 | 1.404 | 0.918 | 0.521 | 1.024 | 0.606 | 1.003 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| H                          | 0.179                                                      | 0.169 | 0.166 | 0.166 | 0.165 | 0.167 | 0.197 | 0.225 | 0.174 | 0.183 | 0.207 | 0.184 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |

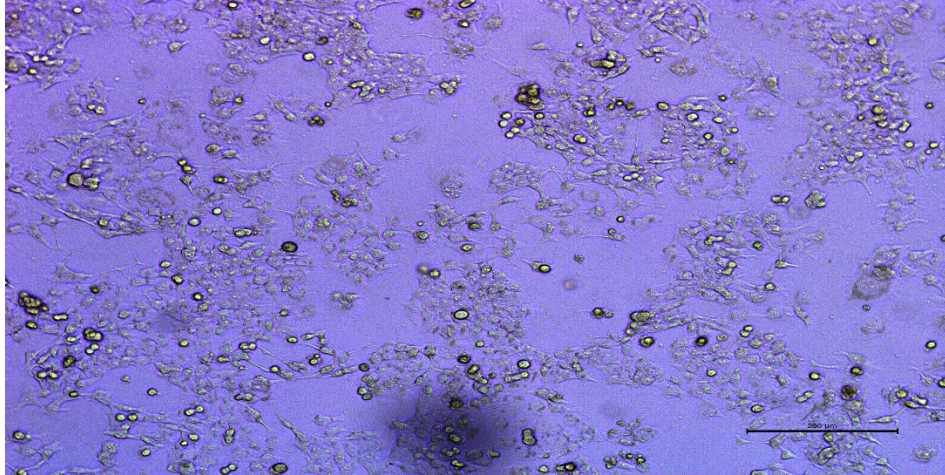
Şekil 3.3. Safra testinde plate okuma işlemine ait örnek excel dosyası

### 3.2.1.d. Farklı sıcaklıklarda gelişimin incelenmesi

Suşların farklı sıcaklıklarda gelişiminin incelenmesi amacıyla 0,5 Mc Farland ayarlı bakteri süspansiyonlarından ilgili besiyerlerine (MRS ve M17 broth) 96'lık plâtelere kullanılarak ekim yapılmıştır. Ekimin ardından plâtelere 10, 15 ve 45°C sıcaklıklarda 3-7 gün inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda kuyucuklarda gözlenen bulanıklık pozitif olarak kabul edilmiştir. Sonuçlar Mikroplate Reader'da (Epoch, BioTek) 600nm



çalışmada kullanılmış diğer bir kısmı ise pasajlanmıştır. Flaska tutunan hücrelerin invert mikroskop altındaki görüntüsü Şekil 3.5’de verilmiştir. Pasajlama için flaskdaki eski besiyeri dökülmüş ve besiyeri kalıntılarını tamamen uzaklaştırmak amacıyla PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma) ile yıkanmış ve ardından PBS uzaklaştırılmıştır. Kültür kabının yüzeyine yapışık halde bulunan hücreleri kaldırmak amacıyla 2 ml %0,25’lik Trypsin/EDTA (Gibco) ilave edilerek 37°C’de 2 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücrelerin yüzeyden kalkma durumu invert mikroskopta incelenmiş ve santrifüj tüplerine alınarak 1000 rpm’de 2 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen pelete taze besiyeri ilave edilerek tripsinizasyon durdurulmuştur (Kullanılan besiyerindeki serum tripsin enzimini inaktive eder). Hücreler taze besiyeri içeren kültür kabına alınarak pasajlanmıştır. Pasajlama sonrası kullanılmayacak fazla hücreleri dondurmak için ise hücre peletine %10 DMSO (Dimetilsülfoksit, Merck) ve %90 besiyeri içeren 1 ml dondurma besiyeri ilave edilerek kriyo tüplere aktarılmıştır. Kriyo tüpler önce yarım saat 4°C’de ve 1 saat -20°C’de bekletilerek kademeli bir sıcaklık düşüşü sağlanmış ve ardından -80°C’de 1 gece bekletilerek sıvı azot tankında depolanmıştır (Kılınç 2016; Yıldız 2018).

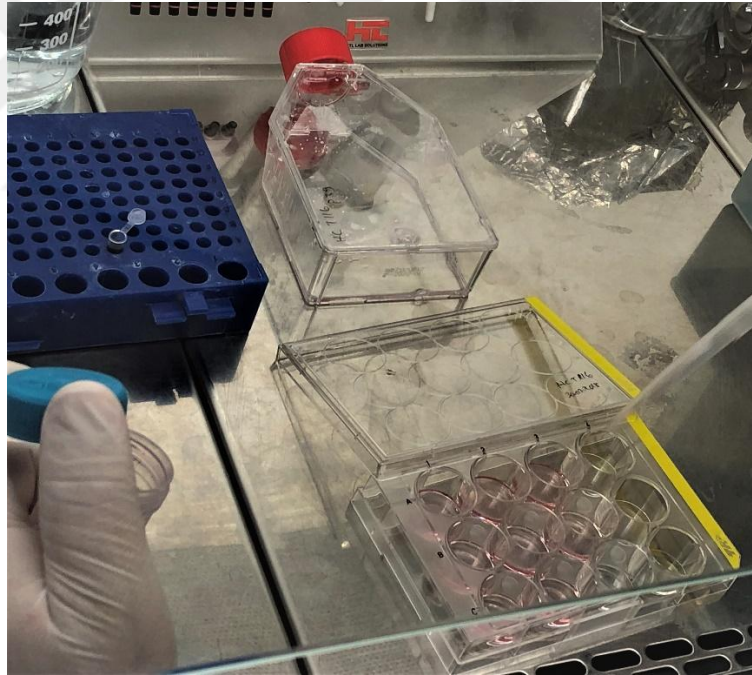


**Şekil 3.5.** Flaska ekilen ve yapışan HCT-116 hücre hattının invert mikroskop altındaki görüntüsü

### 3.2.2.b. Hücre sayımı ve ekimi

Canlı hücre sayısını belirlemek için %0,4'lük Tripan blue boyası (Gibco) kullanılmıştır. Sayım işlemi otomatik hücre sayım cihazında (ADAM-MC2, Genbiotek) gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 90 µl PBS ile 100 µl Tripan blue boyası bir tüp içerisinde karıştırılmıştır. Bu tüpe hazırlanan hücre-besiyeri solüsyonundan 10 µl ilave edilmiş ve pipetaj yapılarak karışması sağlanmıştır. Karışımdan da 10 µl alınarak sayım cihazı yardımı ile hücre konsantrasyonu belirlenmiştir.

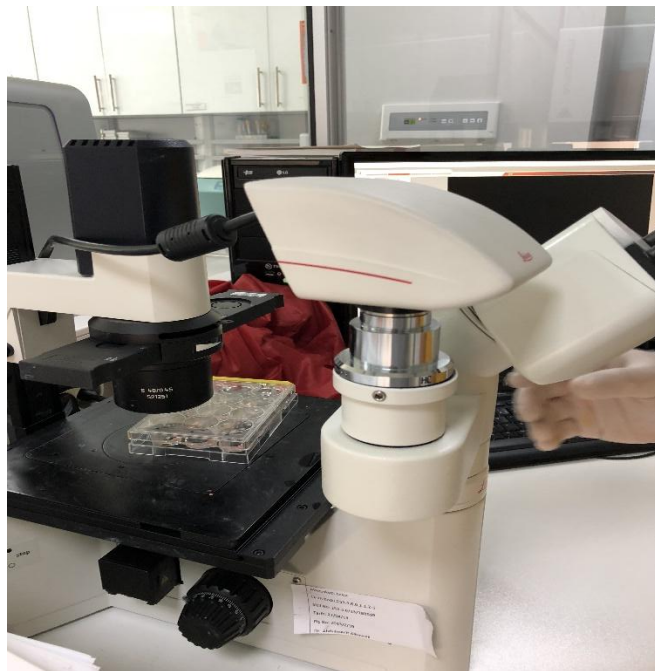
Sayım sonrası her kuyuda  $2 \times 10^5$  hücre olacak şekilde seyreltme işlemi yapılarak 12 kuyucuklu kültür platelerine hücreler aktarılmış ve 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> ve %90 nem şartlarında 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Şekil 3.6'da hücre kültüründe kullanılan 12' lik plate ve flask gösterilmiştir (Klingberg *et al.* 2005; Kılınç 2016; Yıldız 2018)



**Şekil 3.6.** Hücre kültüründe kullanılan flask ve 12'lik plate

### 3.2.2.c. Suşların bağırsak hücreleriyle muamelesi

24 saat inkübe edilerek plate kuyucuklarına tutunumları sağlanan hücreler invert mikroskop altında kontrol edilmiştir. Şekil 3.7’de invert mikroskopta 12’lik platelerin incelenmesine ait bir görüntü verilmiştir. Her bir kuyucuktaki eski besiyeri uzaklaştırılarak taze besiyeri ilave edilmiştir. Denemede kullanılacak laktik suşlar -80°C’den çıkarılarak uygun besiyerinde (MRS, Merck) 24 saat’lik sürede 32°C’de canlandırılmıştır. Genç kültürlerden  $10^8$  kob/ml konsantrasyona ayarlanmış olan bakteri süspansiyonundan 0,5 ml alınarak 12’lik plate kuyucuklarına eklenmiştir. 37°C’de %5 CO<sub>2</sub> ve %90 nem içeren ortamda 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından PBS ile 3 kez hafifçe yıkanarak tutunmayan bakteriler uzaklaştırılmıştır. Bu esnada invert mikroskop kullanılarak hücrelere tutunan bakteriler mikroskobik olarak da görüntülenmiştir. Daha sonra %0,1’lik Triton-X100’ den 1’er ml her kuyucuğa ilave edilip 10 dakika bekletilerek somatik hücre ve bakteri karışımının mikrobiyolojik ekim için hazır hale gelmesi sağlanmıştır. Bağırsak hücrelerine tutunan canlı bakteri sayısını belirlemek için dilüsyonlar hazırlanarak MRS agar’a (Merck) ekim yapılmış ve 32°C’de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Sayım sonucunda bakteri suşlarının bağırsak hücrelerine tutunabilme kapasiteleri başlangıçtaki bakteri sayısı ile kıyaslanarak % olarak belirlenmiştir. Tutunum deneyleri üç tekerrürlü olacak şekilde yapılmıştır (Klingberg *et al.* 2005; Jensen *et al.* 2011; Kılınç 2016; Yıldız 2018;).



**Şekil 3.7.** Hücre kültürü çalışmasında kullanılan invert mikroskop



### **3.2.3. İstatistiksel analizler**

Çalışmada elde edilen veriler SPSS for Windows Release ver. 16.00 paket programı (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) kullanılarak istatistiksel analize tabi tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar, ilgili grafik ve ifadelerde sunulmuştur.



#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Denemede kullanılan bakteri suşları Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarından temin edilmiştir. İlgili bakteri suşlarına ait bazı probiyotiklik özellikleri (mide ortamına direnç, safra tuzlarına tolerans, bağırsak hücrelerine tutunum), farklı sıcaklıklarda gelişebilme yetenekleri, gram özellikleri ve katalaz testi sonuçları aşağıda sunulmuştur.

Çalışmaya; *Lactobacillus plantarum* (78 adet), *Leuconostoc mesenteroides* (9 adet), *Lactobacillus paracasei* (4 adet), *Pediococcus parvulus* (2 adet), *Leuconostoc holzapfelii* (1 adet), *Bacillus* spp. (20 adet), *Pseudomonas fragi* (12 adet), *Bacillus megaterium* (11 adet) olmak üzere toplam 137 adet bakteri suşu ile başlanmıştır. Bu suşlardan 2 tanesi (23 ve 141 numaralı izolat) canlandırma işleminde geri kazanılamamıştır. *Bacillus* spp., *Pseudomonas fragi* ve *Bacillus megaterium* suşları ise turşu üretiminde fermantasyon ve gıda güvenliği açısından uygun bulunmadığından ilerleyen analizlere dahil edilmemiştir. Dolayısıyla çalışma 92 LAB izolatı ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada kullanılan bakteri türleri incelendiğinde *Lactobacillus plantarum* ağırlıklı olduğu görülmektedir. Dursun (2010) tarafından yapılan çalışmada, turşulardan izole edilen LAB'lar API 50 test kitiyle tanımlanmış ve *L. brevis*, *L. acidophilus* ve *L. plantarum* türlerine ait oldukları tespit edilmiştir. Literatür incelendiğinde turşulardan izole edilen LAB'ların *L. brevis* ve *L. plantarum* ağırlıklı oldukları görülmektedir. Çalışmamızda kullandığımız suşlar turşudan izole edilmiş olmasına rağmen genetik tanı sonuçlarında *L. brevis* türüne rastlanmadığı görülmektedir.

İlgili bakteri suşlarının gram özellik, katalaz testi, mide ortamında, safra tuzlarında ve farklı sıcaklık derecelerinde gelişimlerine ait analiz sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Analiz sonuçlarına göre tüm bakteri suşlarının gram (+) ve katalaz negatif olduğu belirlenmiştir.

Bakteri suşlarının %32,6'sı mide ortamında canlılığını sürdürmüştür. Canlı kalabilen bu suşların; %30'u (toplamda %9,8) çok iyi üreme, %40'ı (toplamda %13) iyi üreme, %30'u (toplamda %9,8) ise zayıf üreme göstermiştir. Çizelge 4.1 incelendiğinde *Pediococcus parvulus* ve *Lactobacillus paracasei* türlerinin midmeyi hiç geçemediği ancak *Leuconostoc mesenteroides* ve *Leuconostoc holzapfelii* türlerinin midmeyi çok iyi geçtiği görülmektedir. Suşların büyük bir kısmını oluşturan *Lactobacillus plantarum* türü ise %30 oranında canlılığını sürdürebilmiştir.

Safra tuzlarına toleransın belirlenmesi amacıyla yapılan analizde; %0,3, %0,5 ve %1 oranlarında safra içeren besiyeri kullanılmıştır. Suşların hepsi %0,3 ve %0,5 konsantrasyonlarında gelişim göstermiştir. Yalnızca RN143, RN171 ve RN178 nolu suşlar %1 safra içeren besiyerinde gelişmemiştir. %0,3 safra konsantrasyonunda bakterilerin; %43,5'i çok iyi üreme, %47,8'i iyi üreme, %8,7'si zayıf üreme göstermiştir. 0,5 safra konsantrasyonunda bakterilerin; %30,4'ü çok iyi üreme, %44,6'sı iyi üreme, %25'i zayıf üreme göstermiştir. %1 safra konsantrasyonunda ise bakteri suşlarının; %22,8'i çok iyi üreme, %36,9'u iyi üreme, %36,9'u zayıf üreme göstermiştir. *Leuconostoc mesenteroides* türleri genel olarak üç safra konsantrasyonunda da çok iyi üreme göstermiştir. *Pediococcus parvulus* ve *Lactobacillus paracasei* türleri mide ortamında üreyemezken, safra tuzlarına direnç gösterebilmişlerdir.

Farklı sıcaklık derecelerinde gelişim sonuçları incelendiğinde çalışmadaki bütün bakteri türlerinin 15°C'de çok iyi üreme gösterdiği görülmektedir. LAB'lar 16-32°C aralığında optimum gelişim gösterirler (Daeschel and Fleming 1984). Bu yüzden 15°C'de iyi gelişim göstermeleri beklenen bir sonuçtur. 10°C'de bakterilerin; %10,9'u çok iyi üreme, %33,7'si iyi üreme ve %25'i zayıf üreme göstermektedir. 45°C'de ise bakterilerin; %8,7'si çok iyi üreme, %8,7'si iyi üreme ve %70,6'sı zayıf üreme göstermiştir. Çizelge 4.1'de *Leuconostoc mesenteroides* türlerinin tamamının 45°C'de çok iyi üreme gösterdiği ancak diğer türlerin genel olarak bu sıcaklık derecesinde iyi gelişemediği görülmektedir.

**Çizelge 4.1.** Turşu kökenli bakteri suşlarının bazı fenotipik ve probiyotik özellikleri

| Suş Numarası | Türü                             | Gram Özelliği | Katalaz testi | Mide ortamında gelişim | Safra Tuzlarında Gelişim (%) |     |     | Farklı Sıcaklık Derecelerinde Gelişim |     |     |
|--------------|----------------------------------|---------------|---------------|------------------------|------------------------------|-----|-----|---------------------------------------|-----|-----|
|              |                                  |               |               |                        | 0,3                          | 0,5 | 1   | 10                                    | 15  | 45  |
| RN49         | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | +             | -             | ++                     | +                            | +   | +   | +                                     | +++ | +++ |
| RN57         | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | +             | -             | +++                    | +++                          | +++ | +++ | ++                                    | +++ | +++ |
| RN58         | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | +             | -             | ++                     | +++                          | +++ | +++ | ++                                    | +++ | +++ |
| RN59         | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | +             | -             | -                      | +++                          | +++ | +++ | ++                                    | +++ | +++ |
| RN60         | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | +             | -             | +                      | ++                           | ++  | ++  | -                                     | +++ | +++ |
| RN61         | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | +             | -             | +                      | +++                          | +++ | +++ | ++                                    | +++ | +++ |
| RN63         | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | +             | -             | -                      | +++                          | +++ | +++ | ++                                    | +++ | +++ |
| RN64         | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | +             | -             | +                      | +++                          | +++ | +++ | ++                                    | +++ | +++ |
| RN101        | <i>Lactobacillus plantarum</i>   | +             | -             | -                      | ++                           | +   | +   | +++                                   | +++ | +   |
| RN103        | <i>Lactobacillus plantarum</i>   | +             | -             | -                      | +                            | +   | +   | +++                                   | +++ | +   |
| RN104        | <i>Lactobacillus plantarum</i>   | +             | -             | -                      | ++                           | ++  | +   | ++                                    | +++ | +   |
| RN105        | <i>Lactobacillus plantarum</i>   | +             | -             | ++                     | +++                          | ++  | ++  | ++                                    | +++ | +   |
| RN106        | <i>Lactobacillus plantarum</i>   | +             | -             | -                      | ++                           | +   | +   | ++                                    | +++ | +   |
| RN107        | <i>Lactobacillus plantarum</i>   | +             | -             | +++                    | +++                          | +++ | +++ | ++                                    | +++ | +   |
| RN109        | <i>Lactobacillus plantarum</i>   | +             | -             | -                      | ++                           | ++  | +   | ++                                    | +++ | -   |
| RN110        | <i>Lactobacillus plantarum</i>   | +             | -             | +                      | ++                           | ++  | +   | +                                     | +++ | -   |
| RN111        | <i>Lactobacillus plantarum</i>   | +             | -             | -                      | ++                           | +   | +   | +                                     | +++ | -   |

Çizelge 4.1. (devam)

|       |                                |   |   |     |     |     |     |     |     |    |
|-------|--------------------------------|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| RN112 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | ++  | +   | +   | -   | +++ | +  |
| RN113 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | ++  | ++  | ++  | +++ | +++ | +  |
| RN114 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | +   | +++ | +++ | ++  | -   | +++ | +  |
| RN115 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | ++  | ++  | +   | -   | +++ | +  |
| RN116 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | ++  | ++  | +   | -   | +++ | +  |
| RN117 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | +++ | ++  | ++  | ++  | +++ | +  |
| RN119 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | ++  | +   | +   | ++  | +++ | -  |
| RN120 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | +++ | +++ | +++ | -   | +++ | +  |
| RN121 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | ++  | +   | +   | +   | +++ | +  |
| RN122 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | ++  | ++  | ++  | ++  | +   | +++ | -  |
| RN123 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | +++ | +++ | ++  | +   | -   | +++ | -  |
| RN124 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | ++  | ++  | +   | ++  | +++ | +  |
| RN125 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | +++ | ++  | +   | ++  | +++ | +  |
| RN126 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | +++ | ++  | ++  | ++  | +   | +++ | ++ |
| RN129 | <i>Pediococcus parvulus</i>    | + | - | -   | ++  | +   | +   | -   | +++ | +  |
| RN130 | <i>Pediococcus parvulus</i>    | + | - | -   | +++ | +++ | +++ | -   | +++ | -  |
| RN133 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | ++  | ++  | ++  | -   | +++ | +  |
| RN135 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | ++  | ++  | ++  | ++  | ++  | +++ | +  |
| RN136 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | +   | ++  | ++  | ++  | ++  | +++ | +  |
| RN138 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | ++  | +   | +   | -   | +++ | +  |

Çizelge 4.1. (devam)

|       |                                |   |   |     |     |     |     |    |     |    |
|-------|--------------------------------|---|---|-----|-----|-----|-----|----|-----|----|
| RN139 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | +   | ++  | ++  | ++  | ++ | +++ | +  |
| RN140 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | +++ | +++ | +++ | +  | +++ | +  |
| RN142 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | +++ | +++ | ++  | -  | +++ | +  |
| RN143 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | ++  | ++  | -   | ++ | +++ | +  |
| RN144 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | +++ | +++ | +++ | -  | +++ | +  |
| RN145 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | ++  | +++ | +++ | ++  | -  | +++ | -  |
| RN146 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | +++ | +++ | ++  | ++ | +++ | ++ |
| RN147 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ |
| RN148 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | +++ | ++  | ++  | +  | +++ | +  |
| RN149 | <i>Lactobacillus paracasei</i> | + | - | -   | +   | +   | +   | +  | +++ | +  |
| RN151 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | +++ | +++ | ++  | ++ | +++ | +  |
| RN152 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | ++  | ++  | ++  | ++  | ++ | +++ | +  |
| RN153 | <i>Leuconostoc holzapfelii</i> | + | - | +++ | ++  | ++  | ++  | +  | +++ | +  |
| RN154 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | +  |
| RN155 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | ++  | +   | +   | -  | +++ | +  |
| RN156 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | ++  | +   | +   | -  | +++ | +  |
| RN157 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | +++ | ++  | ++  | ++ | +++ | +  |
| RN159 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | ++  | ++  | +   | +  | +++ | +  |
| RN160 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | ++  | +   | +   | +  | +++ | +  |
| RN161 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | ++  | +   | +   | ++ | +++ | -  |

Çizelge 4.1. (devam)

|       |                                |   |   |    |     |     |     |     |     |    |
|-------|--------------------------------|---|---|----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| RN162 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -  | ++  | ++  | +   | +++ | +++ | +  |
| RN163 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | +  | +++ | ++  | ++  | ++  | +++ | ++ |
| RN164 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -  | ++  | +   | +   | -   | +++ | +  |
| RN166 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +  |
| RN167 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -  | ++  | +   | +   | +++ | +++ | +  |
| RN168 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -  | +++ | +++ | +++ | ++  | +++ | +  |
| RN169 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -  | +++ | ++  | ++  | +   | +++ | +  |
| RN170 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -  | ++  | ++  | ++  | -   | +++ | +  |
| RN171 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -  | ++  | ++  | -   | ++  | +++ | +  |
| RN172 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -  | +   | +   | +   | -   | +++ | +  |
| RN173 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -  | +++ | ++  | +   | ++  | +++ | +  |
| RN174 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -  | ++  | ++  | ++  | +   | +++ | +  |
| RN175 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -  | +++ | +++ | +++ | +   | +++ | +  |
| RN176 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -  | +++ | +++ | +++ | +   | +++ | +  |
| RN177 | <i>Lactobacillus paracasei</i> | + | - | -  | +   | +   | +   | +   | +++ | +  |
| RN178 | <i>Lactobacillus paracasei</i> | + | - | -  | +   | +   | -   | +   | +++ | +  |
| RN179 | <i>Lactobacillus paracasei</i> | + | - | -  | +   | +   | +   | +   | +++ | ++ |
| RN180 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -  | +++ | +++ | +++ | +   | +++ | ++ |
| RN182 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | ++ | +++ | ++  | +   | -   | +++ | +  |
| RN183 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -  | +++ | +++ | +++ | -   | +++ | ++ |

Çizelge 4.1. (devam)

|       |                                |   |   |     |     |     |     |     |     |    |
|-------|--------------------------------|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| RN184 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | +++ | ++  | ++  | -   | +++ | +  |
| RN185 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | ++  | +   | +   | -   | ++  | -  |
| RN186 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | +   | ++  | ++  | ++  | -   | +++ | +  |
| RN187 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | +++ | ++  | ++  | ++  | -   | +++ | +  |
| RN188 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | +++ | ++  | ++  | ++  | +   | +++ | +  |
| RN189 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | +++ | +++ | +++ | +   | +++ | +  |
| RN190 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | +++ | +++ | ++  | -   | +++ | -  |
| RN191 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | ++  | ++  | ++  | -   | +++ | +  |
| RN192 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | ++  | +++ | +++ | ++  | +   | +++ | +  |
| RN193 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | +++ | ++  | ++  | +++ | +++ | ++ |
| RN194 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | ++  | +   | +   | +   | ++  | +++ | +  |
| RN195 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | ++  | ++  | ++  | -   | +++ | +  |
| RN196 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | -   | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +  |
| RN199 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | +++ | ++  | ++  | ++  | +++ | +++ | +  |
| RN200 | <i>Lactobacillus plantarum</i> | + | - | ++  | ++  | ++  | ++  | +++ | +++ | +  |

- : Üreme görülmemiştir (Absorbans değeri=kör numune)

+

++ : Zayıf üreme (Absorbans değeri <1)

+++ : İyi üreme (1<Absorbans değeri<1,5)

+++ : Çok iyi üreme (1,5 < Absorbans değeri)

Mide ortamı için; +: 20-30%; ++: 40-49%; +++: 50-60%; -: Üreme görülmemiştir.

Mide ortamına ve en az %0,3 safra tuzlarına dayanıklılık gösteren suşlar muhtemel probiyotik olarak belirlenmiştir. Bakteri suşlarının %32,6'sının hem mide hem de safra tuzlarına direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Bu suşlar; RN49, RN57, RN58, RN60, RN61, RN64, RN105, RN107, RN110, RN114, RN122, RN123, RN126, RN135, RN136, RN139, RN145, RN152, RN153, RN154, RN163, RN166, RN182, RN186,

RN187, RN188, RN192, RN194, RN199 ve RN200 olmak üzere 30 tanedir. Mide ve safra tuzlarına dayanıklılık açısından bu 30 suşun muhtemel probiyotik olarak değerlendirilebileceği görülmüştür.

Lim and Im (2008) tarafından yapılan bir çalışmada Kore'ye ait dongchimi, kimchi, meju gibi turşu benzeri fermente gıdalardan izole edilen 22 adet bakteri suşunun mide ortamı ve safra tuzlarına dayanıklılıkları test edilmiştir. 22 izolattan 15'inin mide ortamına, 14'ünün ise safra tuzlarına dayanıklılık gösterdiği belirlenmiştir. Hem mide hem de safra tuzlarına direnç gösteren 12 izolat tespit edilmiştir. Bu çalışmada izolatların %54,5'i hem mide hemde safra tuzlarına direnç gösterirken, bizim yaptığımız çalışmada izolatların %32,6'sı her iki ortamada direnç göstermiştir.

Kimoto *et al.* (1999) tarafından yapılan bir çalışmada probiyotik oldukları bilinen 9 laktik asit bakterisinin, mide ortamı ve safra tuzlarında hayatta kalabilme durumları incelenmiştir. Bu 9 suştan 4'ü (%44,4) hem mide hem de safra ortamında canlı kalabilmiştir.

Hırvatistan ve Sırbistan'dan geleneksel olarak üretilmiş beyaz peynirlerden LAB izole edilerek bunların mide ortamı ve safra tuzlarına dirençlerinin belirlenmesinin amaçlandığı bir çalışma Uroic *et al.* (2014) tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 86 adet LAB izole edilmiş ve bunlardan 26'sı (%30,2) mide ortamı ve safra tuzlarına direnç gösterebilmiştir. Araştırma sonuçları çalışmamız verileriyle kıyaslandığında benzer oldukları görülmektedir.

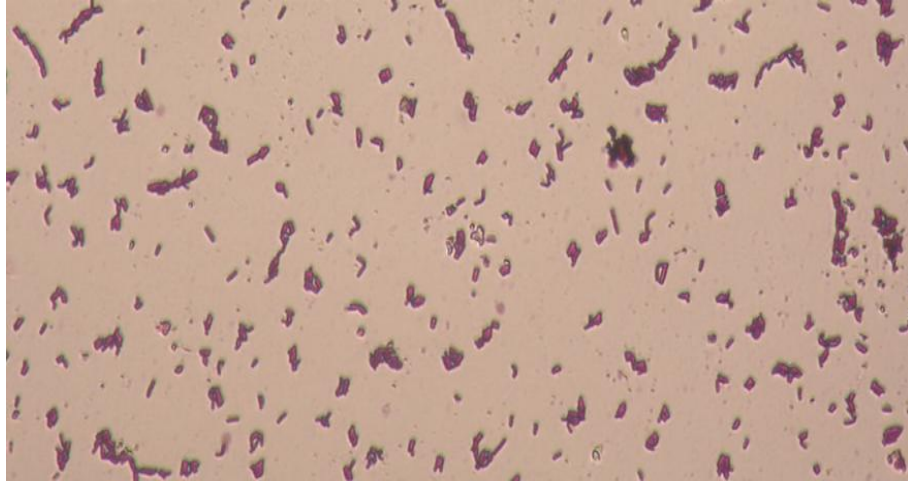
Pisano *et al.* (2014) süt ürünlerinden izole edilen laktobasillerin probiyotik olarak kullanılabilirliklerini belirlemeyi amaçlayan bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu kapsamda toplam 23 adet *Lactobacillus* suşu izole edilerek bunların mide ve safra tuzlarına karşı dirençleri incelenmiştir. İlgili suşlardan 6'sı (%26) gastrointestinal sistem koşullarında hayatta kalmayı başarmıştır.

Samanje (2018) 50 adet süt örneğinden izole ettiği 103 adet laktobasil suşunun mide ortamı ve safra tuzlarına toleransını incelemiştir. 29 bakteri suşu mide ortamında canlı kalabilmiştir. Mide ortamında hayatta kalabilen bakterilerin ise sadece 14 tanesi safra tuzlarına direnç gösterebilmiştir. Sonuç olarak bakteri suşlarının %13,6'sı hem mide hem de safra koşullarına dayanıklılık göstermiştir. Bizim çalışmamızla kıyaslandığında, mide ve safra ortamına daha düşük direnç gösterdikleri görülmektedir.

Alp (2018) tarafından yapılan bir çalışmada çeşitli gıda ve bitkilerden izole edilen 69 LAB, mide ortamı ve safra tuzlarına dirençleri açısından incelenmiştir. 47 izolat safra tuzlarına karşı canlılıklarını devam ettirebilirken, bunların içinden 11 izolat mide koşullarında canlılıklarını kaybetmiştir. Toplamda 36 izolat (%52,2) hem mide hem de safra koşullarında hayatta kalmayı başarmıştır. Her iki ortamda direnç gösterebilen bakteri yüzdesi bizim çalışmamızdan daha fazladır. Ancak safra tuzlarına direnç açısından incelendiğinde her iki çalışmada da bakterilerin hemen hemen hepsinin safra tuzlarını tolere edebildiği görülmektedir.

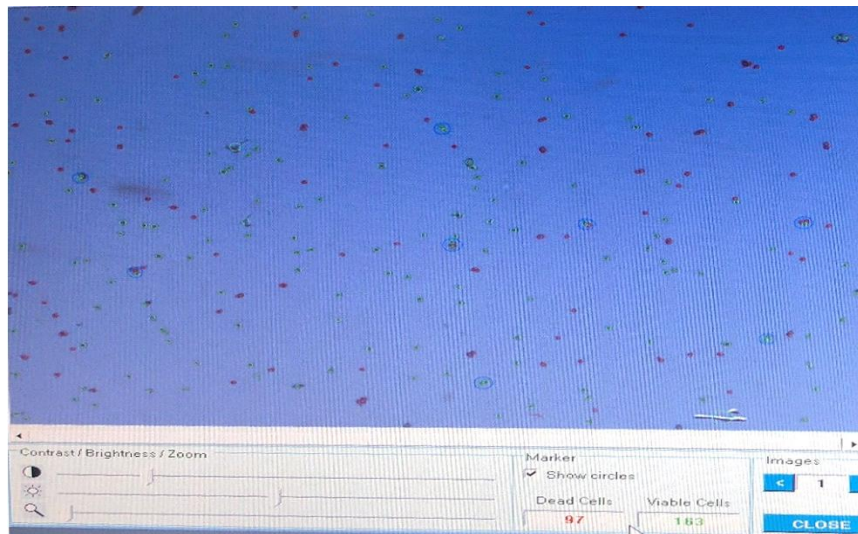
Dursun (2010) tarafından yapılan bir çalışmada 51 adet LAB suşunun 10°C, 15°C ve 45°C'de gelişimleri incelenmiştir. 10°C'de hiçbir bakteri gelişmemiştir. 15°C'de 34 adet ve 45°C'de ise sadece 8 adet suş gelişebilmiştir. Sonuçlar bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir.

Çizelge 4.1 incelendiğinde, *Lactobacillus plantarum* RN107 ve *Lactobacillus plantarum* RN154 suşlarının hem mide hem de %0,3, %0,5 ve %1 konsantrasyonlarında safra içeren besiyerinde çok iyi gelişebildiği görülmektedir. Ayrıca bu suşların 10°C, 15°C ve 45°C'de gelişebilmeleri ileride farklı ürün üretimlerinde de kullanılabileceklerini göstermektedir. Dolayısıyla gastrointestinal sistemde diğer suşlara göre daha iyi üreme gösteren, her ikisinde *Lactobacillus plantarum* türüne ait olan bu iki bakterinin hücre kültürü testinde *in vitro* koşullarda bağırsak hücrelerine tutunumları incelenmiştir. *Lactobacillus plantarum* RN154 suşunun basit boyama ardından mikroskoptaki görüntüsü Şekil 4.1'de verilmiştir.



**Şekil 4.1.** *Lactobacillus plantarum* RN154 suşunun mikroskopik görüntüsü

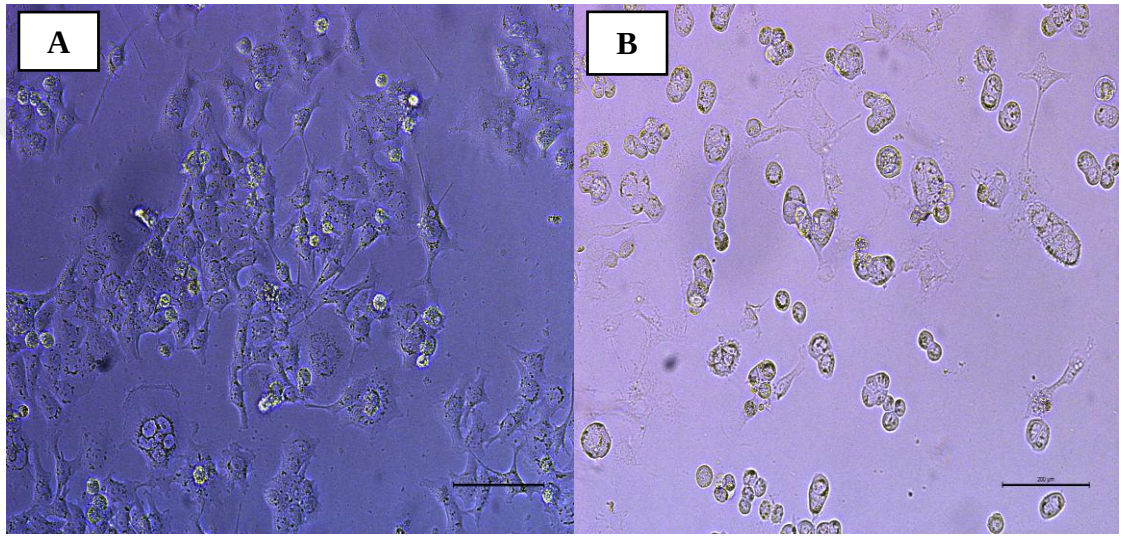
Denemede kullanılan hücre kültürü hatları Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilimdalı laboratuvarlarından temin edilmiştir. Hücre kültürü analizinde, bağırsak hücresi olan HCT-116 ve HT-29 hücre hatları kullanılarak *Lactobacillus plantarum* RN107 ve *Lactobacillus plantarum* RN154 suşlarının bağırsak hücrelerine tutunumu incelenmiştir. Flasklara ekilen hücreler inkübasyonun ardından çalışmada kullanılmak üzere hücre sayım cihazı ile sayılmıştır. İlgili cihaz kullanılarak elde edilen ölü ve canlı hücrelere ait görüntü Şekil 4.2’de sunulmuştur.



**Şekil 4.2.** Hücre sayımı sonucunda gözlemlenen ölü ve canlı hücreler

İşlem sonunda ekranda görülen yeşil hücreler canlı, kırmızılar ise ölü olarak değerlendirilmiştir. Böylece ml'deki canlı hücre sayısı belirlenmiştir.

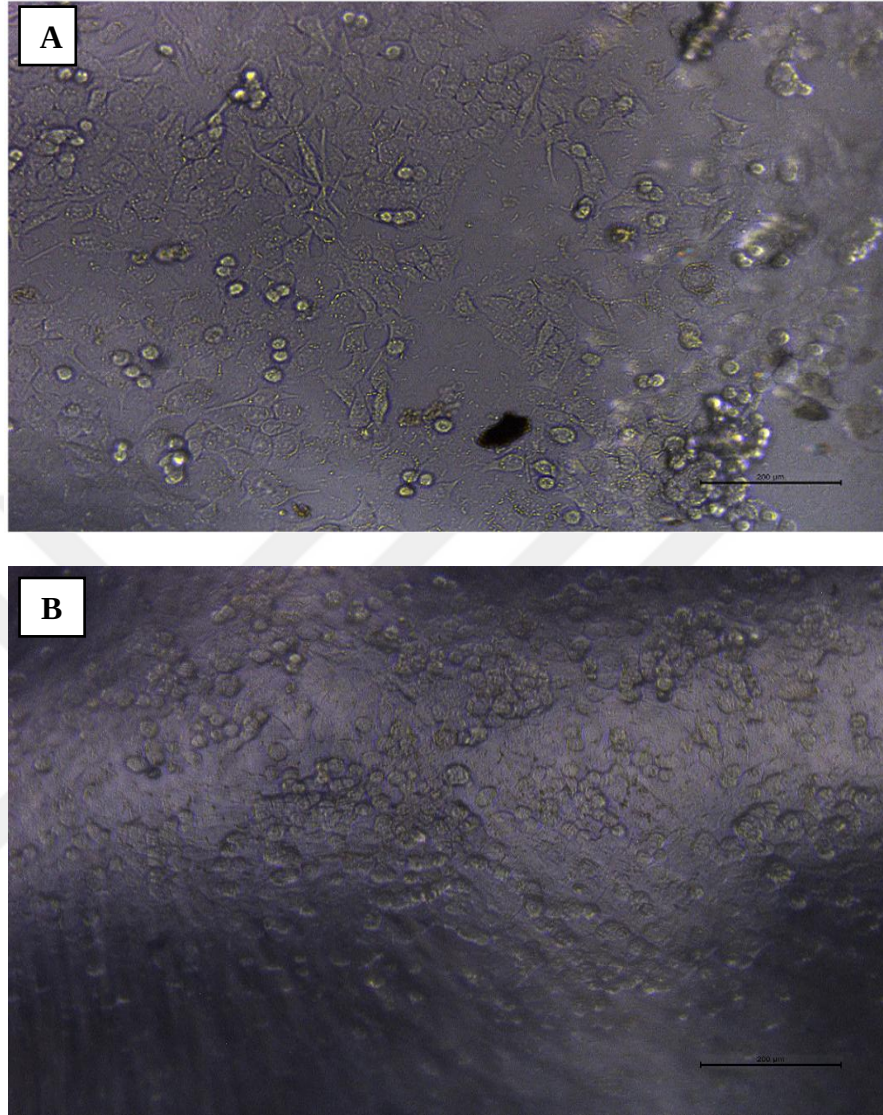
HCT-116 ve HT-29 hücre hatları 12 kuyucuklu platelere ekildikten 24 saat sonra yüzeye yapışmaya başlayan hücrelerin sitoplazmik uzantılar oluşturdıkları invert mikroskopta gözlenmiştir. İlgili hücelere ait mikroskop görüntüleri şekil 4.3'de verilmiştir.



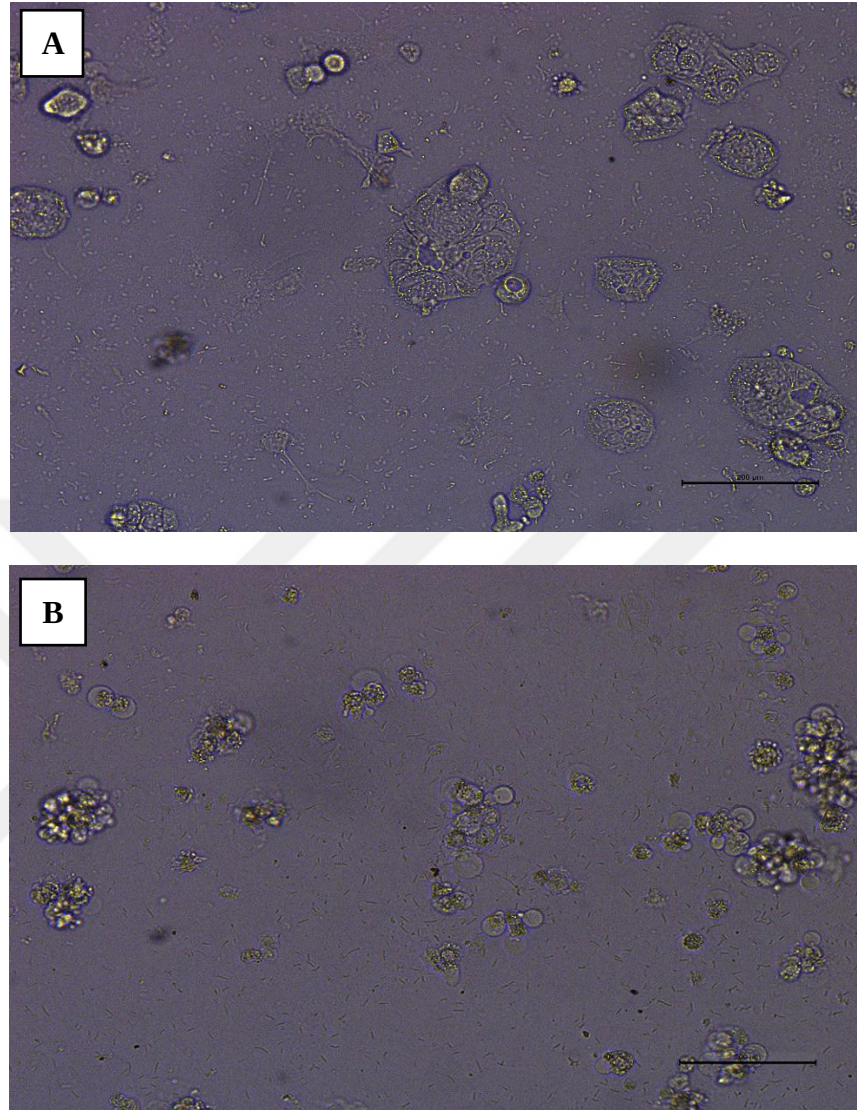
**Şekil 4.3.** Uygulama öncesi hücre hatlarının görüntüsü (A: HCT-116, B:HT-29)

24 saat inkübe edilerek hücrelerin plate kuyucuklarına yapışması sağlandıktan sonra  $10^8$  kob/ml konsantrasyonuna ayarlanmış olan bakteri solüsyonlarından (RN107 ve RN154 suşları) 0,5 ml alınarak 12'lik plate kuyucuklarına eklenmiştir. 1 saatlik inkübasyonun ardından plateler invert mikroskopta görüntülenmiştir. Şekil 4.4'de HCT-116 hücre hattının, *Lactobacillus plantarum* RN107 ve *Lactobacillus plantarum* RN154 bakteri solüsyonları ile ayrı ayrı muamelesinden 1 saat sonraki mikroskobik görüntüleri verilmiştir. Şekil 4.5'de ise HT-29 hücre hattının uygulama sonrasındaki mikroskobik görüntüsü verilmiştir.

Şekil 4.4 ve 4.5 incelendiğinde basil şeklindeki bakterilerin bir kısmının besiyerinde serbest halde, diğer kısmının ise hücelere tutunmuş halde olduğu gözlenmektedir.

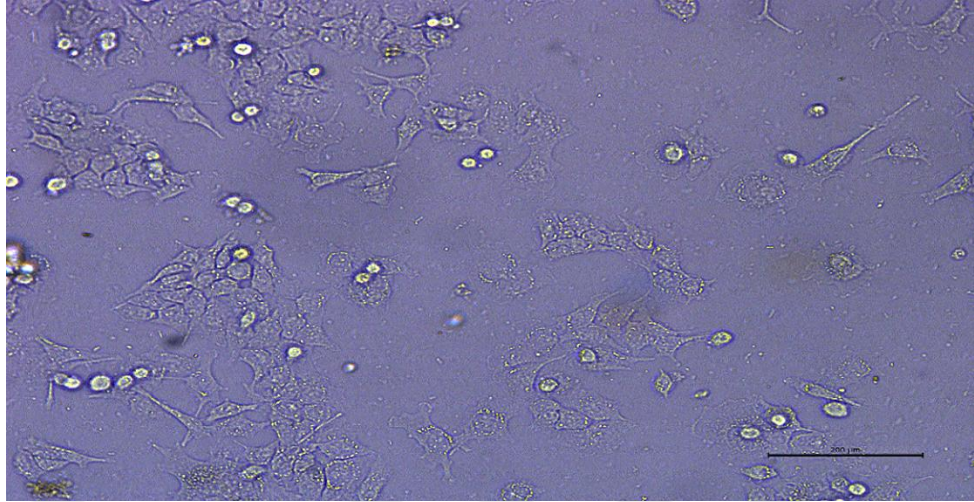


**Şekil 4.4.** Bakteri suşları ile uygulama sonrası HCT-116 hücrelerine ait görüntü (A: RN107, B: RN154)



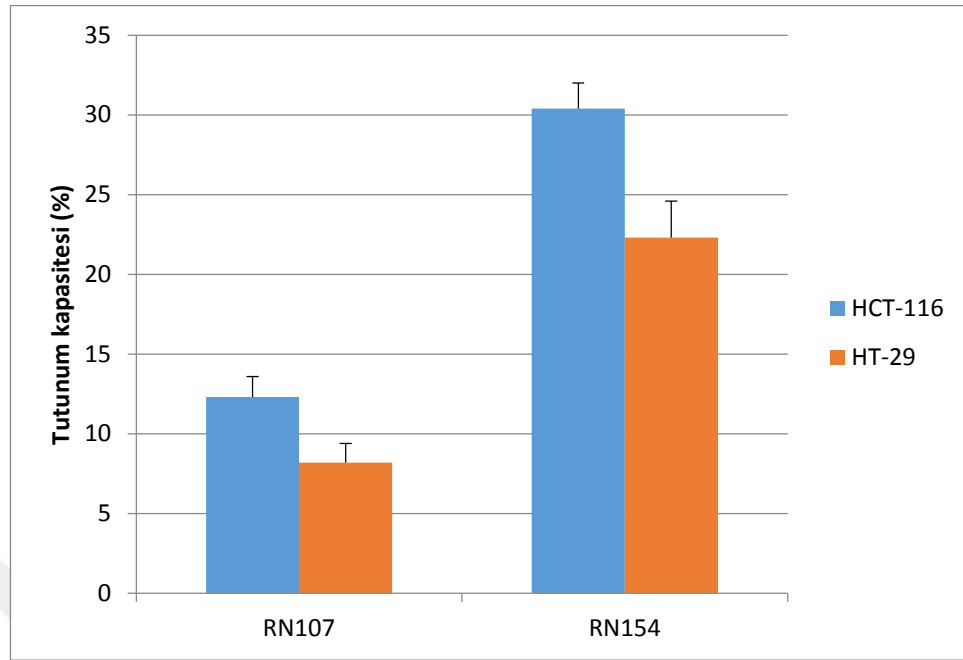
**Şekil 4.5.** Bakteri suşları ile uygulama sonrası HT-29 hücrelerine ait görüntü (**A:** RN107, **B:** RN154)

İnkübasyonun ardından hücre hatları PBS ile yıkanarak tutunmayan hücreler uzaklaştırılmıştır ve hücrelerin mikroskopik görüntüsü alınmıştır. Şekil 4.6’da yıkama işleminden sonra HCT-116 hücre hattının görüntüsü verilmiştir. Yıkama sonrası platelerin invert mikroskop altındaki görüntüleri incelendiğinde, besiyerinde serbest halde bulunan bakterilerin uzaklaştığı ve sadece hücrelere tutunan bakterilerin kaldığı görülmektedir.



**Şekil 4.6.** Yıkama işlemi sonrası HCT-116 hücre hattının mikroskopik görüntüsü

Bağırsak hücrelerine tutunan canlı bakteri sayısını belirlemek için, %0,1'lik TritonX100 ile muamelenin ardından dilisyonlar hazırlanarak MRS agar'a ekim yapılmıştır. İnkübasyonun sonunda petrilerde gelişen bakteri kolonileri sayılmıştır. Bakteri suşlarının bağırsak hücrelerine tutunum kapasitesi, sayım sonucunda elde edilen bakteri sayısı ile başlangıçta hücrelerle muamele edilen bakteri sayısının kıyaslanmasıyla % olarak belirlenmiştir. Şekil 4.7'de *Lactobacillus plantarum* RN107 ve *Lactobacillus plantarum* RN154 suşlarının, HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarına tutunum kapasiteleri (%) grafik şeklinde verilmiştir.



**Şekil 4.7.** RN107 ve RN154 numaralı suşların, HCT-116 ile HT-29 hücre hatlarına tutunum kapasitelerine (%) ait grafik

Çalışmada test edilen suşların tutunum kapasiteleri incelendiğinde, HCT-116 hücre hattına; *Lactobacillus plantarum* RN107 suşunun %12,3, *Lactobacillus plantarum* RN154 suşunun ise %30,4 oranında tutunduğu görülmektedir. HT-29 hücre hattına ise RN107 suşu %8,2 ve RN154 suşu %22,3 oranında tutunmuştur. Her iki bakteri suşunun da HCT-116 hücre hattına daha iyi tutunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca RN154 numaralı suşun RN107'ye oranla her iki hücre hattına daha yüksek oranda tutunduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla RN154 numaralı bakteri suşunun RN107'ye kıyasla bağırsak hücrelerine tutunma kapasitesinin çok daha fazla olduğu görülmektedir.

Lim and Im (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, Kore'ye ait turşu benzeri bazı fermente gıdalardan izole edilen LAB'ların bazı probiyotik özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda suşların asit ve safra tuzlarına toleransının tespiti yanısıra, 12 adet LAB, Caco-2 ve HT-29 hücre hatlarına tutunma kapasitesi açısından da incelenmiştir. 4 suş %50'den daha fazla tutunum kapasitesine sahipken, diğer suşlar ortalama her iki hücre hattına da %20 civarında bir tutunum göstermiştir. Sonuç olarak 12 suş ise muhtemel probiyotik olarak kabul edilmiştir. Bizim çalışmamızda maksimum

tutunma %30,4 iken bu çalışmada %50'yi geçtiği, ancak bu çalışmada ki suşların ortalama tutunum yüzdesi dikkate alındığında bizim çalışmamızla paralellik gösterdiği görülmektedir.

Schillinger *et al.* (2005) tarafından yapılan çalışmada, 18 adet LAB *in vitro* koşullarda bağırsak epitel hücrelerine tutunumları açısından incelenmiştir. Bu amaçla mukus salgılayan HT-29 MTX hücre hattı kullanılmıştır. *L. rhamnosus* GG referans suş olarak kullanılmıştır. Bütün suşlar HT29-MTX hücre hattına tutunabilmiş ve suşların çoğu %20-%40 oranında bir tutunum göstermiştir. En yüksek tutunum kapasitesine %63 ile *L. acidophilus* BFE 704 suşunun sahip olduğu tespit edilmiştir. Referans olarak kullanılan *L. rhamnosus* GG suşu tutunum kapasitesi ise %27 olarak gözlemlenmiştir. *L. acidophilus* BFE 704 suşunun çok yüksek tutunum yüzdesine sahip olmasına karşın, diğer suşların bizim çalışmamızdaki suşların tutunum yüzdeleri ile paralellik gösterdiği görülmektedir.

Tuomola and Salminen (1998) tarafından yapılan bir çalışmada, 12 farklı *Lactobacillus* suşunun Caco-2 hücre hattına tutunumu test edilmiştir. Caco-2 hücre hattına en iyi tutunan suş *L. casei* (%14) olurken, en az tutunum gösteren suşun *L. casei* var. *rhamnosus* (%3) olduğu görülmüştür. Bizim çalışmamızda *Lactobacillus plantarum* RN154 suşunu %30,4 ile max. tutunum göstermiştir. Tuomola and Salminen (1998) tarafından yapılan çalışma ile kıyaslandığında tutunum kapasitesinin bizim çalışmamızda daha yüksek olduğu görülmektedir.

6 adet *Lactobacillus* suşunun Caco-2 hücrelerine tutunumunu inceleyen çalışma Pisano *et al.* (2014) tarafından gerçekleştirilmiştir. Suşlar %3 ile %20 arasında değişen oranlarda tutunum göstermiştir. Çalışmamızda ise en düşük tutunum yüzdesi 8,2'dir. Dolayısıyla bizim çalışmamızda kullandığımız suşların tutunum kapasitesinin daha yüksek olduğu görülmektedir.

Kimoto *et al.* (1999) tarafından yapılan bir çalışmada, 9 *Lactococcus* suşunun Caco-2 hücrelerine tutunumu incelenmiştir. 2 adet *Lactobacillus* suşu ise pozitif ve negatif

kontrol olarak kullanılmıştır. Bu suşlardan 2'sinin çok yüksek tutunma kapasitesine sahip olduğu, 5'inin düşük tutunma kapasitesine sahip olduğu görülmüştür.

Okuklu (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, 30 muhtemel probiyotik suşun (25'i laktobasil, 5'i laktokok) Caco-2 epitel hücrelerine yapışma kabiliyetleri incelenmiştir. Suşların hepsinin Caco-2 epitel hücrelerine tutunabildiği, tutunma kapasitesinin ise %42,97 ile %77,2 arasında değiştiği gözlenmiştir. Bizim çalışmamız ile kıyaslandığında, bu çalışmada sonuçların çok daha yüksek olduğu görülmektedir.

14 laktobasil suşunun HT-29 hücre hattına tutunumunun belirlenmesini amaçlayan çalışma Samançe (2018) tarafından gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak 14 suştan 6'sının HT-29 hücrelerine çok iyi bir şekilde yapıştığı tespit edilmiştir.

## 5. SONUÇ

Çalışmamızda kullanılan bakteriler, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarından temin edilmiştir. Bu kapsamda 92 adet turşu kökenli LAB ile çalışılmış ve bu bakteriler bazı mikrobiyolojik analizler ile hücre kültürü analizine tabi tutulmuştur. Mikrobiyolojik analiz olarak; gram boyama, basit boyama, katalaz testi, mide ortamı ile safra tuzlarına direncin belirlenmesi ve farklı sıcaklıklarda gelişimin incelenmesi deneyleri yapılmıştır. Mikrobiyolojik analizler sonucunda en iyi özelliğe sahip iki suş seçilerek hücre kültürü analizi yapılmıştır.

Yapılan analizler sonucunda aşağıda belirtilen bulgular tespit edilmiş olup ilgili sonuçlara varılmıştır.

- Çalışmada kullanılan tüm bakterilerin gram (+) ve katalaz negatif olduğu belirlenmiştir.
- Bakteri suşlarının hepsinin 15°C’de çok iyi üreme gösterdiği ancak 10°C ve 45°C’de ise zayıf üreme gösteren suşların da olduğu gözlenmiştir.
- Mide ortamı ve safra tuzlarına direnci incelenen 92 bakteri suşundan %32,6’sının hem mide hem de safra tuzlarına direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Bu suşlar; RN49, RN57, RN58, RN60, RN61, RN64, RN105, RN107, RN110, RN114, RN122, RN123, RN126, RN135, RN136, RN139, RN145, RN152, RN153, RN154, RN163, RN166, RN182, RN186, RN187, RN188, RN192, RN194, RN199 ve RN200 olmak üzere 30 tanedir. Mide ve safra bariyerlerini geçen bu suşların muhtemel probiyotik olarak değerlendirilebileceği görülmüştür.

- Yapılan analizler sonucunda en üstün özelliklere sahip olan *Lactobacillus plantarum* RN107 ve *Lactobacillus plantarum* RN154 suşları bağırsak hücrelerine tutunum açısından *in vitro* koşullarda incelenmiştir. Bu kapsamda Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilimdalı laboratuvarlarından temin edilen HCT-116 ve HT-29 hücre hatları kullanılmıştır. Hücre kültürü analizi sonucunda bu iki suşun her iki hücre hattına da tutunabildiği görülmüştür. Tutunum oranlarının %8,2-%30,4 arasında değiştiği ve suşların HCT-116 hücre hattına daha yüksek oranlarla tutunduğu tespit edilmiştir. İnsan bağırsak hücrelerine tutunum yeteneği, en önemli probiyotik özelliklerden biridir (Guo *et al.* 2016). Dolayısıyla mide ve safra bariyerlerini çok iyi bir şekilde geçen ve bağırsak hücrelerine tutunabilen *Lactobacillus plantarum* RN107 ve *Lactobacillus plantarum* RN154 numaralı suşların iyi birer probiyotik adayı oldukları söylenebilir.
- Elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda, başta hücre kültürü analizine tabi tutulan iki suş olmak üzere, mide ve safra ortamında canlı kalabilen suşların hepsinin, probiyotikliğinin belirlenmesinde kullanılan daha ileri testlere de tabi tutularak probiyotikliklerinin kanıtlanabileceği düşünülmektedir.
- Mide ortamı ve safra tuzlarını tolere edebilen suşların, farklı sıcaklıklarda gelişim yeteneklerine ek olarak; farklı tuz ve pH seviyelerinde gelişim ile glikozdan gaz oluşturma gibi starter kültür karakteristikleri de belirlenerek elde edilecek probiyotik suşların turşu üretiminde kullanılması hedeflerimiz arasındadır.
- Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri uzun yıllardan beri bilinmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarla probiyotiklerin birçok yararlı etkisinin kanıtlanmasıyla günümüzde tüketicilerin probiyotik ürünlere ilgisi oldukça artmıştır (Gürkan 2018; Kav 2019). Turşu hem probiyotik sayısına erişim hem de prebiyotik ilavesine uygunluğu nedeniyle iyi bir fonksiyonel gıda olabilir. Özellikle ülkemizde turşu üretim ve tüketiminin oldukça fazla

miktarlarda olması nedeniyle probiyotik turşu üretiminin toplum sağlığını olumlu etkileyeceği görülmektedir.



## KAYNAKLAR

- Aakef, J.N.A., 2018. Hurmadan İzole Edilen Mayaların Bazı Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması. Y. Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Aiba, Y., Suzuki, N., Kabir, A., Takagi, A., Koga, Y., 1998. Lactic Acid-Mediated Suppression of *Helicobacter pylori* by the Oral Administration of *Lactobacillus Salivarius* as A Probiotic in A Gnotobiotic Murine Model. *American Journal of Gastroenterology*, 93(11), 2097-2101.
- Akman, E., 2009. Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Özelliklerinin İncelenmesi. Y. Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.
- Aktan, N., Yücel, U., Kalkan, H., 1998. Turşu Teknolojisi. E. Ü. Ege Meslek Yüksek Okulu Yayınları No:23, E. Ü. Basımevi, İzmir, 138s.
- Aktaş., H. 2018. Ev Yapımı ve Endüstriyel Olarak Üretilen Yoğurtların Mikrobiyolojik Özelliklerinin İncelenmesi ve Potansiyel Probiyotik Suşların Belirlenmesi. Y. Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Alp, D., 2018. Doğal Kaynaklardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması ve *In Vitro* Bağırsak Modelinde Patojenlerin Tutunmasını Engelleme Özelliklerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Alp, D., Ertürkmen, P., 2017. Probiyotik Olarak Kullanılan *Lactobacillus* spp. Suşlarının Kolesterol Düşürücü Etkileri ve Olası Mekanizmalar. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 8(1), 108-113.
- Anonim, 2016. Probiyotik Nedir ve Faydaları Nelerdir? <https://www.neoldu.com> (10.01.2019).
- Anonim, 2018. Probiyotik Bakteriler Nelerdir. <http://www.probiyotik.net/probiyotik-bakteriler-nelerdir/> (24.01.2019).
- Anonim, 2019. What are Probiotics? [www.usprobiotics.org](http://www.usprobiotics.org) (21.01.2019).
- 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, 282-291.
- Arıcan, G.Ö., 2019. Memeli Hücre ve Doku Kültürü. İstanbul, <https://docplayer.biz.tr/20274129-Memeli-hucre-ve-doku-kulturu.html> (16.01.2019).
- Ark, M., Özdemir, A., Şimay, Y.D., İbişoğlu, B., 2017. Hücre Kültürü ve Temel Moleküler Biyoloji Protokolleri. Ankara Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti, 150 s, Ankara.
- Arora, M., Sharma, S., Baldi, A., 2013. Comparative Insight of Regulatory Guidelines for Probiotics in USA and Malaysia. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 2, 51-64.
- Bassaganya-Riera, J., Viladomiu, M., Pedragosa, M., Simone, C., Hontecillas, R., 2012. Immunoregulatory Mechanisms Underlying Prevention of Colitis-Associated Colorectal Cancer by Probiotic Bacteria. *PLoS One*, 7, 1-8.

- Billoo, A.G., Memon, M.A., Khaskheli, S.A., Murtaza, G., Iqbal, K., Shekhani, M.S., Siddiqi, A.Q., 2006. Role of A Probiotic (*Saccharomyces boulardii*) in Management and Prevention of Diarrhoea. *World Journal of Gastroenterology*, 12, 4557-4560.
- Botes, M., Loos, B., Van-Reenen, C.A., Dicks, L.M.T., 2008. Adhesion of the Probiotic Strains *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 to Caco-2 Cells Under Conditions Simulating the Intestinal Tract, and in the Presence of Antibiotics and Anti-Inflammatory Medicaments. *Archives of Microbiology*, 190(5), 573-584.
- Breidt, F., McFeeters, R. F., Perez-Diaz, I., Lee, C., 2013. Fermented Vegetables. 841-855. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 4th Ed. Edited by M. P. Doyle and R. L. Buchanan © 2013 ASM Press, Washington, D.C.
- Bullen, C.L., Willis, A.T., 1971. Resistance of the Breast-Fed Infant to Gastroenteritis. *BMJ Journal*, 3, 338-343.
- Cetin, B., 2011. Production of Probiotic Mixed Pickles (Tursu) and Microbiological Properties. *African Journal of Biotechnology*, 10(66), 14926-14931.
- Ceyhan, N., Alıç, H., 2012. Bağırsak Mikroflorası ve Probiyotikler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 5(1), 107-113.
- Chen, J., Gaikwad, V., Holmes, M., Murray, B., Povey, M., Wang, Y., Zhang, Y., 2011. Development of a Simple Model Device for *In Vitro* Gastric Digestion Investigation. *Food and Function*, 2, 174-182.
- Collins, J.K., Thornton, G., Sullivan, G.O., 1998. Selection of Probiotic Strains for Human Applications. *International Dairy Journal*, 8, 487-490.
- Coşkun, T., 2006. Probiyotikler, Prebiyotikler ve Sinbiyotikler. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 49(2), 128-148.
- Crittenden, R., Laitila, A., Forssell, P., Mattö, J., Saarela, M., Sandholm, M. T., Myllärinen, P., 2001. Adhesion of Bifidobacteria to Granular Strach and Its Implications in Probiotic Technologies. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3469-3475.
- Çetinkaya, M., Köksal, N., 2004. Nekrotizan Enterokolit. *Güncel Pediatri*, 2, 146-151.
- Giamarellos-Bourboulis, E.J., Bengmark, S., Kanellakopoulou, K., Kotzampassi K., 2009. Pro- and Synbiotics to Control İnflammation and İnfection in Patients with Multiple İnjuries. *Journal of Trauma*, 67(4), 815-821.
- Çiftçi, C., 2019. Mide Asidi: Bilmeniz Gereken Her Şey. <https://www.fitekran.com/mide-asidi/> (22.01.2019).
- Çomak-Göçer, E.M.Ç., Ergin, F., Küçükçetin, A., 2016. Sindirim Sistemi Modellerinde Probiyotik Mikroorganizmaların Canlılığı. *Akademik Gıda*, 14(2), 158-165.
- Daeschel, M.A., Anderson, R.E., Fleming, H.P., 1987. Microbial Ecology of Fermenting Plant Materials. *FEMS Microbiology Reviews*, 46, 357-367.
- De Melo Pereira, G.V., Coelho, B.D.O., Junior, A.I.M., Thomaz-Soccol, V., Soccol, C.R., 2018. How to Select A Probiotic? A Review and Update of Methods and Criteria. *Biotechnology Advances*, 0734-9750.
- Demirören, K., Özen, H., 2012. İnflamatuar Bağırsak Hastalıklarının Tedavisinde Probiyotikler. *Türkiye Klinikleri Pediatric Sciences*, 8(3), 34-42.
- De-Palencia, P.F., López, P., Corbi, A.L., Peláez, C., Requena, T., 2008. Probiotic Strains: Survival Under Simulated Gastrointestinal Conditions, *In Vitro*

- Adhesion to Caco-2 Cells and Effect on Cytokine Secretion. *European Food Research and Technology*, 227(5), 1475–1484.
- Doğan, M., 2012. Probiyotik Bakterilerin Gastrointestinal Sistemdeki Etki Mekanizması. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 7(1), 20-27.
- Dos-Reis, S.A. da-Conceição, L.L., Siqueira, N.P., Rosa, D.D., da-Silva, L., do-Carmo G. Peluzio, M., 2016. Review of the Mechanisms of Probiotic Actions in the Prevention of Colorectal Cancer. *Nutrition Research*, 37, 1-19.
- Duary, R.K., Rajput, Y.S., Batish, V.K., Grover, S., 2011. Assessing the Adhesion of Putative Indigenous Probiotic Lactobacilli to Human Colonic Epithelial Cells. *Indian Journal Medical Research*, 134(5), 664–671.
- Dunne, C., 2001. Adaptation of Bacteria to the Intestinal Niche: Probiotics and Gut Disorder. *Inflammatory Bowel Diseases*, 7(2), 136-145.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F., Collins, J.K., 2001. *In Vitro* Selection Criteria for Probiotic Bacteria of Human Origin: Correlation with *In Vivo* Findings. *American Society for Clinical Nutrition*, 73, 386-92.
- Elcioglu, O., Kunduhoglu, B., 2014. Probiotic Characteristics of Natural Lactobacilli Isolated from Traditional Kargı Tulum Cheese. *Italian Journal of Food Science*, 26, 31-41.
- Engüdar, G., 2012. Safra Tuzlarının Model Lipid Membranlar ile Etkileşimi. Y. Lisans Tezi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Ergin, F., Göçer, E.M.Ç., Arslan, A.A., Küçükçetin, A., 2015. Probiyotikler ile İlgili Yasal Düzenlemeler. *Akademik Gıda*, 13(3), 229-236.
- Evren, M., Apan, M., Tutkun, E., Evren, S., 2011. Geleneksel Fermente Gıdalarda Bulunan Laktik Asit Bakterileri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 9(1), 11-17.
- Fooks, L.J., Fuller, R., Gibson, G.R., 1999. Prebiotics, Probiotics and Human Gut Microbiology. *International Dairy Journal*, 9(1), 53-61.
- Franz, C.M.A.P., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., Galvez, A., 2011. Enterococci As Probiotics and Their Implications in Food Safety. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 125-140.
- Gibson, G.R., 1998. Dietary Modulation of the Human Gut Microflora Using Probiotics. *British Journal of Nutrition*, 80, 209-212.
- Gionchetti, P., Rizello, F., Venturi, A., Campieri, M., 2000. Probiotics in Infective Diarrhoea and Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 15, 489-493.
- Goldin, BR., 1998. Health Benefits of Probiotics. *British Journal of Nutrition*, 80(4), 203-207.
- Gopal, P.K., Prasad, Jaya., Smart, J., Gill, H.S., 2001. *In Vitro* Adherence Properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 Strains and Their Antagonistic Activity Against an Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 67, 207-216.
- Guarino, A., Canani, R., Spagnuolo, M., Albano, F., Di Benedetto, L., 1997. Oral Bacterial Therapy Reduces the Duration of Symptoms and Viral Excretion in Children with Mild Diarrhoea. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 25(5), 516-519.

- Guo, C., Zhang, L.W., Han, X., Yi, H.X., Li, J.Y., Tuo, Y.F., Zhang, M.D., Du, M., Shan, Y.J., Yang, L., 2014. Screening for Cholesterol-Lowering Probiotic Based on Deoxycholic Acid Removal Pathway and Studying its Functional Mechanisms *In Vitro*. *Anaerobe*, 18(5), 516-522.
- Gülel, Ş., 2014. Molecular Identification and Probiotic Properties of '*Lactobacillus acidophilus* Group' Isolates From Turkish Kefir. Y.Lisans Tezi, Orta Doğu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Gürkan, B., 2018. Çeşitli Kaynaklarda Probiyotik Mayaların İzolasyonu ve İdentifikasyonu. Y. Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova, İzmir.
- Gürsoy, O., Kınık, Ö., Gönen, İ., 2005. Probiyotikler ve Gastrointestinal Sağlığa Etkileri. *Türk Mikrobiyal Cem Dergisi*, 35, 136-148.
- Hao, Q., Dong, B.R., Wu, T., 2015. Probiotics for Preventing Acute Upper Respiratory Tract Infections. *The Cochrane Collaboration*, 2, CD006895.
- Harman, M., Knol, J., 2006. Quantitative Real-Time Pcr Analysis of Fecal *Lactobacillus* Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2359-2365.
- Hill, M.J., Draser, B.S., 1968. Degradation of Bile Salts by Human İntestinal Bacteria. *Gut*, 9, 22-27.
- Hossain, M. I., Sadekuzzaman, M., Ha, S. D., 2017. Probiotics as Potential Alternative Biocontrol Agents in the Agriculture and Food Industries. *Food Research International*, 100, 63-73.
- Hummel, A.S., Hertel, C., Holzapfel, W.H., Franz, C.M.A.P., 2007. Antibiotic Resistances of Starter and Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 730-739.
- Iemoli, E., Trabattoni, D., Parisotto, S., Borgonovo, L., Toscano, M., Rizzardini, G., Clerici, M., Ricci, E., Fusi, A., De Vecchi, E., Piconi, S., Drago, L., 2012. Probiotics Reduce Gut Microbial Translocation and İmprove Adult Atopic Dermatitis. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 46, 33-40.
- İnanç, N., Şahin, H., Çiçek, B., 2005. Probiyotik ve Prebiyotiklerin Sağlık Üzerine Etkileri. *Erciyes Tıp Dergisi (Erciyes Medical Journal)*, 27(3), 122-127.
- Jacobson, G.K., 2015, Yeasts as Probiotics: Established in Animals, but What About Man, In *Probiotics and Prebiotics. Current Research and Future Trends*, 8, 115-134.
- Jensen, H., Grimmer, S., Naterstad, K., Axelsson, L., 2011. *In Vitro* Testing of Commercial and Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 216-222.
- Kabak, B., 2009. Turşu üretimi ve Fermantasyonda Rol Oynayan Mikroorganizmalar. II. Geleneksel Gıdalar Sempzyumu, 27-29 Mayıs, Van, pp. 834-837.
- Kabak, B., Dobson, A. D., 2011. "An İntroduction to the Traditional Fermented Foods and Beverages of Turkey." *Crit Rev Food Sci Nutr*, 51(3), 248-260.
- Kasper, H., 1998. Protection Against Gastrointestinal Diseases – Present Facts and Future Developments. *International Journal Food Microbiology*, 41(2), 127-131.
- Kav, 2019. İntestinal Mikrobiyota Nedir? Ne yapar?. [http://turkhipertansiyon.org/pdf/18\\_kongre\\_sunum/Nefro\\_Mikrobiyota.pdf](http://turkhipertansiyon.org/pdf/18_kongre_sunum/Nefro_Mikrobiyota.pdf) (28.01.2019).

- Kılınç, A., 2016. Neonikotinoit Grubu İnsektisitlerin Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
- Kıray, E., Kariptaş, E., 2015. Probiyotikler, Prebiyotikler ve Sinbiyotiklerin Kolorektal Kanseri İlişkisi. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR, 13(1), 28-46.
- Kimoto, H., Kurisaki, J., Tsuji, N.M., Ohmomo, S., Okamoto, T., 1999. Lactococci as Probiotic Strains: Adhesion to Human Enterocyte-Like Caco-2 Cells and Tolerance to Low pH and Bile. Letters in Applied Microbiology, 29, 313-316.
- 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, 419-43.
- Koca, T.T., 2015. Bağırsak Mikroflorasının İnflamatuvar Hastalık Patogenezindeki Yeri. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 24(1), 78-91.
- Kundakçı, A., Ergönül, B., 2006. Probiyotik Gıda Nedir? Ne Değildir?. Türkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu.
- Kuş, H., 2010. İnsan Orjinli Probiyotik Bakteriler Kullanarak Probiyotik Ayran Üretimi. Y. Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Laurens-Hattin, A., Viljoen, B.C., 2001. Yogurt as Probiotic Carrier Food. International Dairy Journal, 11(1-2), 1-17.
- Lim, S.M., Im, D.S., 2008. Screening and Characterization of Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Korean Fermented Foods. J. Microbiol. Biotechnol., 19(2), 178-186.
- Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., Tsakalidou, E., 2006. Probiotic Potential of Lactobacillus Strains Isolated from Dairy Products. Int. Dairy J, 16, 189-199.
- Martín, R., Jiménez, E., Olivares, M., Marín, M.L., Fernández, L., Xaus, J., Rodríguez, J.M., 2006. *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a Potential Probiotic Strain Isolated from Infant Feces and Breast Milk of a Mother-Child Pair. International Journal of Food Microbiology, 112, 35-43.
- Mohania, D., Kansal, V.K., Sagwal, R., Shah, D., 2013. Anticarcinogenic Effect of Probiotic Dahi and Piroxicam on DMH-Induced Colorectal Carcinogenesis in Wistar Rats. American Journal of Cancer Therapy and Pharmacology, 1, 1-17.
- Molbay, D., Çekin, M.D., 1999. Probiyotikler ve Prebiyotiklerin Önemi. Türk Aile Hekimliği Dergisi, 3(3-4), 85-88.
- Mukai, T., Asasaka, T., Sato, E., Mori, K., Matsumoto, M., Ohori, H., 2002. Inhibition of Binding of *Helicobacter pylori* to the Glycolipid Receptors by Probiotic *Lactobacillus reuteri*. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 32(2), 105-110.
- Naidu, A. S., Bidlack, W. R., Clemens, R. A., 1999. Probiotic Spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB). Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 39(1), 13-126.
- Okuklu, B., 2014. Isolation, Characterization, and Screening Probiotic Properties of Artisanal Yoghurt Starter Strains From Urla Region. Y. Lisans Tezi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir.
- Önal, D., Beyatlı, Y., Aslım, B., 2005. Probiyotik Bakterilerin Epitel Yüzeylere Yapışması. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 3(9), 1-10.

- Önal, D., 2010. Geleneksel Türk Peynirlerinde Propiyonik Asit Bakteri Türlerinin Belirlenmesi ve Bazı Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Biyoloji, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Paul, W. O., Jakki, C. C., 2008. Probiotic Bacteria Influence the Composition and Function of the Intestinal Microbiota. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 1-9.
- Pereira, G.V.M., Coelho, B.O., Júnior, A.I.M., Soccol, V.T., Soccol, C.R., 2018. How to Select a Probiotic? A Review and Update of Methods and Criteria. *Biotechnology Advances*, 36, 2060-2076.
- Peres, C.M., Peres, C., Mendoza, A.H., Malcata, F.X., 2012. Review on Fermented Plant Materials as Carriers and Sources of Potentially Probiotic Lactic Acid Bacteriae With an Emphasis on Table Olives. *Trends in Food Science & Technology*, 26, 31-42.
- Pisano, M.B., Viale, S., Conti, S., Fadda, M.E., Deplano, M., Melis, M.P., Deiana, M., Cosentino, S., 2014. Preliminary Evaluation of Probiotic Properties of *Lactobacillus* Strains Isolated from Sardinian Dairy Products. *Biomed Research International*, 10, 1155-2014.
- Prasad, J., Gill, H., Smart, J., Gopal, P.K., 1998. Selection and Characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Strains for Use as Probiotics. *International Dairy Journal*, 8, 993-1002.
- Priyodip, P., Prakash, P. Y., Balaji, S., 2017. Phytases of Probiotic Bacteria: Characteristics and Beneficial Aspects. *Indian Journal of Microbiology*, 57(2), 148-154.
- Reid, G., 2016. Probiotics: Definition, Scope and Mechanisms of Action. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 30(1), 17-25.
- Rodrigues, A.C.P., Cara, D.C., Fretez, S.H.G.G., Cunha, F.Q., Vieira, E.C., Nicoli, J.R., and Vieira, L.Q., 2000. *Saccharomyces boulardii* Stimulates sIgA Production and the Phagocytic System of Gnotobiotic Mice. *Journal of Applied Microbiology*, 89(3), 404-414.
- Ross, S., Aleljung, P., Robert, N., Lee, B., Wadstrom, T., Lindberg, M., Jonsson, H., 1996. A Collagen Binding Protein From *Lactobacillus reuteri* is Part of an ABC Transporter System. *FEMS Microbiology Letters*, 144, 33-38.
- Sağdıç, O., Küçüköner, E., Özçelik, S., 2004. Probiyotik ve Prebiyotiklerin Fonksiyonel Özellikleri. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35(3-4), 221-228.
- Salminen, S., Deighton, M.A., Benno, Y., Gorbach, S.L., 1998. Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. In: Salminen S., Von Wright, A. Ads., *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc. pp. 211-254.
- Salminen, S., Isolauri, E., Wright, A., 2003. Safety of Probiotic Bacteria. *Reviews in Food and Nutrition Toxicity*, Ed: V.R. Preedy, Taylor and Francis Group, New York, USA, 271-283.
- Salminen, S., Von-Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., Fondén, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E., Matilla-Sandholm, T., 1998. Demonstration of Safety of Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 44(1-2), 93-106.

- Samanje, J., 2018. Investigation of Probiotic and Biosurfactant Properties of *Lactobacillus* Isolated from Different Fermented Foods. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Savaiano, A.D., AbouElAnouar, A., Smith, E.D., Levitt, M.D., 1984. Lactose Malabsorption from Yogurt, Pasteurized Yogurt Sweet Acidophilus Milk and Cultured Milk in Lactase Deficient Individuals. American Journal of Clinical Nutrition, 40, 1219-1223.
- Schillinger, U., Guigas, C., Holzapfel, W.H., 2005. *In vitro* Adherence and Other Properties of Lactobacilli Used in Probiotic Yoghurt-Like Products. International Dairy Journal, 15, 1289-1297.
- S  raphin, B., Hettich, R., 2012. Molecular Mechanisms of Probiotic Action: a Proteomic Perspective. Current Opinion in Microbiology, 15, 390-396.
- Sert, S., 2011. Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Notları, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Yayınlar No: 138, Erzurum.
- Sezen, A.G., 2013. Prebiyotik, Probiyotik ve Sinbiyotiklerin İnsan ve Hayvan Sağlığı  zerine Etkileri. Atatürk Üniversitesi Veterinerlik Bilimleri Dergisi. 8(3), 248-258.
- Shenderov, B.A., 2011. Probiotic (Symbiotic) Bacterial Languages. Molecular Biology Genetics and Biotechnology, Anaerobe, 17, 490-495.
- Spanhaak, S., Havenaar, R., Schaafsma, G., 1998. The Effect of Consumption of Milk Fermented by *Lactobacillus casei* Strain Shirota on the Intestinal Microflora and immune Parameters in Humans. European Journal of Clinical Nutrition, 52(12), 899-907.
- Stiles, M. E., Holzapfel, W.H., 1997. Lactic Acid Bacteria of Foods and Their Current Taxonomy. International Journal of Food Microbiology, 36, 1-29.
- Sullivan, A., Nord, C.E., 2002. The Place of Probiotics in Human Intestinal Infections. International Journal of Antimicrobial Agents, 20(5), 313-319.
- Sullivan, A., Nord, C.E., 2005. Probiotics and Gastrointestinal Diseases. Journal of Internal Medicine 257(1), 78-92.
- Tannis, A., 2008. How You Can Use Probiotics to Fight Cholesterol, Cancer, Suberbugs, Digestive Complaints and More. Harper Collins Publishers Ltd., Toronto, Ontario, Canada.
- Taşdemir, A., 2017. Probiyotikler, Prebiyotikler ve Sinbiyotikler. Kastamonu Sağlık Akademisi, 2(1), 71-88.
- Temiz, A., 2016. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. 7. Baskı. Hatiboėlu Yayınevi. Ankara.
- Tharmaraj, N., Shah, NP., 2003. Selective Enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Propionibacteria*. Journal of Dairy Science, 86(7), 2288-2296.
- TNO, 2017. TIM Gastrointestinal Systems. Netherlands, [https://www.tno.nl/media/4057/tim\\_gastrointestinal\\_systems.pdf](https://www.tno.nl/media/4057/tim_gastrointestinal_systems.pdf) (30.01.2018).
- Tuomola, M.E., Salminen, S.J., 1998. Adhesion of Some Probiotic and Dairy *Lactobacillus* Strains to Caco-2 Cell Cultures. International Journal of Food Microbiology, 41, 45-51.
- Uroic, K., Nikolic, M., Kos, B., Pavunc, A.L., Beganovic, J., Lukic, J., Jovcic, B., Filipic, B., Milikovic, M., Golic, N., Topisirovic, L., Cadez, N., Raspor, P.,

- Suskovic, J., 2014. Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Croatian Fresh Soft Cheese and Serbian White Pickled Cheese. *Food Technology and Biotechnology*, 52(2), 232-241.
- Uymaz, B., 2010. Probiyotikler ve Kullanım Alanları. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 16(1), 95-104.
- Üçok, K., Mollaoğlu, H., Genç, Abdurrahman., Akkaya, Muzaffer., Şener, Ü., 2010. Safra Sistemi Fizyolojisi. *Cerrahi Sanatlar Dergisi*, 3(1), 1-8.
- Vemuri, R., Shinde, T., Shastri, M.D., Perera, A.P., Tristram, S., Martoni, C.J., Gundamaraju, R., Ahuja, K.D.K., Ball, M., Eri R., 2018. A Human Origin Strain *Lactobacillus acidophilus* DDS-1 Exhibits Superior *In Vitro* Probiotic Efficacy in Comparison to Plant or Dairy Origin Probiotics. *International Journal of Medical Sciences*, 15(9), 840-848.
- Verdenelli, M.C., Ghelfi, F., Silvi, S., Orpianesi, C., Cresci, A., 2009. Probiotic Properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* Isolated from Human Faeces. *European Journal of Nutrition*, 48(6), 355–363.
- Walker, D.K., Gilliland, S.E., 1993. Relationships Among Bile Tolerance, Bile Salt Deconjugation, and Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 76(4), 956-961.
- Yavuzdurmaz, H., 2007. Isolation, Characterization, Determination of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria From Human Milk. Y. Lisans Tezi, İzmir İleri Teknoloji ve Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Yıldız, H., 2011. Turşu ve Zeytinlerden Laktik Asit Bakterileri ile Mayaların İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Elde Edilen İzolatların Bazı Özelliklerinin Belirlemesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Yıldız, M., 2018. Azurinin *Lactococcus lactis*'te Rekombinant Üretimi, Antimikrobiyal ve Sitotoksik Etkisinin Araştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Yılmaz, M., 2004. Prebiyotik ve Probiyotikler. *Güncel Pediatri Dergisi*, 2, 142-145.
- Yurdakök, M., 2013. Yoğurdun Öyküsü ve Probiyotiklerin Tarihi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 56(1), 43-60.
- Zago, M., Fornasari, M.E., Carminati, D., Burns, P., Suárez, V., Vinderola, G., Reinheimer, J., Giraffa, G., 2011. Characterization and Probiotic Potential of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Cheeses. *Food Microbiology*, 28, 1033-1040.

## ÖZGEÇMİŞ

1993 yılında Erzurum’da dünyaya geldi. İlköğrenimini Bursa’da tamamladıktan sonra orta öğrenimine Erzurum-Hilalkent Lisesi’nde devam etti. Öğrenimine 2011 yılında başladığı Atatürk Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nden 2015 yılında dereceyle mezun oldu. Aynı yıl lisansüstü eğitim almaya hak kazandı. Bir yıl boyunca İngilizce Hazırlık Eğitimi aldıktan sonra 2016 yılında yüksek lisans eğitimine başlamış ve tez çalışmalarını 2019’da tamamlamıştır.

