AZERBAYCAN'IN FARKLI BÖLGELERİNDEN TEMİN EDİLEN EV YAPIMI ŞARAP ÖRNEKLERİNDEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU, BAZI PROBİYOTİK VE TEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Narmin KARİMOVA

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

2025

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

AZERBAYCAN'IN FARKLI BÖLGELERİNDEN TEMİN EDİLEN EV YAPIMI ŞARAP ÖRNEKLERİNDEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU, BAZI PROBİYOTİK VE TEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

(Isolation, Identification, and Determination of Some Probiotic and Technological Properties of Lactic Acid Bacteria from Homemade Wine Samples Obtained from Different Regions of Azerbaijan)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Narmin KARİMOVA

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Erzurum

Temmuz, 2025

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Narmin KARİMOVA tarafından hazırlanan "Azerbaycan'ın Farklı Bölgelerinden Temin Edilen Ev Yapımı Şarap Örneklerinden Edilen Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, İdentifikasyonu, Bazı Probiyotik ve Teknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi" başlıklı çalışması 04/07/2025 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bilim Dalında Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU *Atatürk Üniversitesi*	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL *Atatürk Üniversitesi*	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Kenan KARAGÖZ *Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi*	Aslı Islak İmzalıdır

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

Prof. Dr. Alper NUHOĞLU
Enstitü Müdürü
Aslı Islak İmzalıdır

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: FYL-2024-14606

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.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında sunulan *"Azerbaycan'ın Farklı Bölgelerinden Temin Edilen Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, İdentifikasyonu, bazı Probiyotik ve Teknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi"* başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	4	**30**
Kuramsal Temeller	2	**30**
Materyal ve Yöntem	28	**35**
Bulgular ve Tartışma	5	**20**
Sonuç ve Öneriler	0	**20**
Tezin Geneli	14	**25**

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

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)
Narmin KARİMOVA
4.7.2025
İmza: Aslı Islak İmzalıdır

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
4.7.2025
İmza: Aslı Islak İmzalıdır

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

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

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

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunulan bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından FYL-2024-14606 no'lu Yüksek Lisans Tez Projesi kapsamında alınan destek ile Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL yöneticiliğinde hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma için, danışmanlığımı üstlenen çalışmamın yürütülmesinden tezin yazım sürecine dek her türlü yardımını, bilgi ve deneyimini esirgemeyen, engin bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, çok kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e

Tezimin her aşamasında sürekli iletişimde bulunduğum ve yardımlarını esirgemeyen, Sayın Prof. Dr. Gülşah Çanakçı ADIGÜZEL ve Doç. Dr. Mustafa Özkan BALTACI'ya,

Çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi. Mehmet Akif ÖMEROĞLU ve Sayın Arş. Gör. Şeyda ALBAYRAK'a,

Benden samimiyetlerini, güzel sözlerini ve yardımlarını esirgemeyen, dostluklarını hep arayacağım çok değerli arkadaşlarım Şeymanur GÜVEN, Amina İBRAHİMOVA, Azade ALİYEVA ve Kamran MURSAL'a ve

Evlatları olmaktan gurur duyduğum, varlıkları ve dualarıyla beni desteklemekten bir an olsun vazgeçmeyen, hayattaki duruşları ile beni bugünlere kadar taşıyan babam Mushfig KARİMOV'a, annem Sama KARİMOVA'ya, dedem Nazir KARİMOV'a, ablam Nazrin KARİMOVA'ya, erkek kardeşim Harun KARİMOV'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım

Narmin KARİMOVA

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AZERBAYCAN'IN FARKLI BÖLGELERİNDEN TEMİN EDİLEN EV YAPIMI ŞARAP ÖRNEKLERİNDEN ELDE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU, BAZI PROBİYOTİK VE TEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Narmin KARİMOVA

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Amaç: Bu tez çalışmasının amacı, Azerbaycan'dan temin edilen ev yapımı şarap örneklerinden saptanan laktik asit bakterilerinin (LAB) fenotipik ve genotipik özelliklerini belirleyerek; probiyotik potansiyellerini, teknolojik niteliklerini ve gıda güvenliği açısından uygunluklarını değerlendirmektir. Bu kapsamda, elde edilen suşların hem gıda sistemlerinde doğal biyokoruyucu olarak kullanılabilirliği hem de fonksiyonel gıdalarda probiyotik ajan olarak insan sağlığına katkı potansiyeli araştırılacaktır.

Yöntem: Bu tezde, şarap örneklerinden LAB izolasyonu yapılarak; izolatlar fenotipik ve biyokimyasal testlerle karakterize edildi. Gıda güvenliği açısından antibiyotik duyarlılığı, hemolitik, antibakteriyel aktivite, biyofilm ve biyojenik amin (BA) üretimi değerlendirildi. Probiyotik özellikler kapsamında pH, safra tuzu, etanol ve gastrointestinal sistem (GİS) koşullarına direnç deneyleri yapıldı. Teknolojik özellikler bakımından ise asitleştirme yeteneği, kolesterol asimilasyonu, enzimatik ve antioksidan aktivite özellikler incelendi. Uygun özelliklere sahip izolatlar moleküler düzeyde tanılanması yapıldı.

Bulgular: Şarap örneklerinden elde edilen 120 izolattan 85'i Gram pozitif ve katalaz negatif olarak seçildi. Gıda güvenliği kriterlerine uygun, antibiyotik direnci gösteren, BA ve biyofilm oluşturmayan 15 izolat belirlenerek, probiyotik ile teknolojik özellikler bakımından uygun parametrelere sahip üç izolat seçildi ve moleküler düzeyde tanılanması yapıldı.

Sonuçlar: Elde edilen veriler doğrultusunda, tüm parametreler açısından olumlu özellikler gösteren NK5 izolatının %99,87 oranında *Lacticaseibacillus paracasei subsp. paracasei*, NK12 izolatının %99,8 oranında *Lactiplantibacillus argentoratensis* ve NK25 izolatının %99 oranında *Lactiplantibacillus pentosus* türlerine benzerlik gösterdiği belirlendi. İzolatların sahip oldukları probiyotik ve teknolojik özelliklerle potansiyel bir LAB olarak değerlendirilebileceği sonucuna varıldı. Özellikle BA ve biyofilm oluşturmamaları, GRAS (Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen) statüsündeki mikroorganizmalar olarak kullanılabilme potansiyelleri, bu izolatları gıda güvenliği ve endüstriyel uygulamalar açısından son derece değerli kılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Laktik asit bakterisi, Probiyotik, Teknolojik, Şarap, İdentifikasyon

Temmuz 2025, 78 sayfa

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

ISOLATION, IDENTIFICATION, AND DETERMINATION OF SOME PROBIOTIC AND TECHNOLOGICAL PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA FROM HOMEMADE WINE SAMPLES OBTAINED FROM DIFFERENT REGIONS OF AZERBAIJAN

Narmin KARİMOVA

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Purpose: The aim of this thesis is to determine the phenotypic and genotypic characteristics of lactic acid bacteria (LAB) identified from homemade wine samples obtained from Azerbaijan, to assess their probiotic potential, technological qualities, and suitability for food safety. In this context, the obtained strains will be investigated for their utility as natural biopreservatives in food systems and their potential to contribute to human health as probiotic agents in functional foods.

Method: In this thesis, LAB were isolated from wine samples and the isolates were characterized using phenotypic and biochemical tests. Antibiotic susceptibility, hemolytic activity, antibacterial activity, biofilm production, and biogenic amine (BA) production were evaluated for food safety. Probiotic properties included resistance to pH, bile salts, ethanol, and gastrointestinal (GI) conditions. Technological properties included acidification ability, cholesterol assimilation, and enzymatic and antioxidant activity. Isolates with suitable characteristics were identified at the molecular level.

Results: Of the 120 isolates obtained from wine samples, 85 were selected as Gram-positive and catalase-negative. Fifteen isolates that met food safety criteria, exhibited antibiotic resistance, and did not form BA or biofilm were identified. Three isolates with suitable probiotic and technological parameters were selected and identified at the molecular level.

Conclusion: Based on the obtained data, isolate NK5, which exhibited positive characteristics in all parameters, was determined to be 99.87% similar to *Lacticaceaeibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, isolate NK12 was 99.8% similar to *Lactiplantibacillus argentoratensis*, and isolate NK25 was 99% similar to *Lactiplantibacillus pentosus*. It was concluded that these isolates could be considered potential LAB due to their probiotic and technological properties. In particular, their lack of BA and biofilm formation, and their potential to be used as GRAS (Generally Recognized as Safe) microorganisms, make these isolates extremely valuable for food safety and industrial applications.

Keywords: Lactic acid bacteria, Probiotic, Technological, Wine, Identification

June 2025, 78 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU ii
TEŞEKKÜR iii
ÖZET iv
ABSTRACT v
TABLOLAR DİZİNİ x
ŞEKİLLER DİZİNİ xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xii
GİRİŞ 1
KURAMSAL TEMELLER 3
Laktik Asit Bakterileri 3
Şarapta Bulunan Laktik Asit Bakterileri 5
Probiyotikler 5
Düşük pH direnci 6
Simüle edilmiş mide ve bağırsak sıvısına karşı direnç 7
Safra direnci 7
Hidrofobisite 8
Etanol toleransı 8
Otolitik aktivite 9
Laktik Asit Bakterilerinin Teknolojik Özellikleri 9
Enzimatik Aktiviteler 9
Asitleştirme yeteneği 10
Antioksidan aktivite 11
Kolestrol asimilasyonu 11
Laktik Asit Bakterilerinde Gıda Güvenliği 12
Hemolitik aktivite 12
Antibiyotik duyarlılığı 12
Antibakteriyel aktivite 12
Biyojen amin 13
Biyofilm 13
MATERYAL VE METOT 15

Kullanılan Malzemeler 15
Kullanılan Materyaller ve Cihazlar 17
Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı 18
Çalışmada Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması 18
Bakteri İzolasyonu 19
Örneklerin toplanması 19
Laktik asit bakterilerinin izolasyonu 19
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Fenotipik ve Morfolojik Karakterizasyonu 19
Gram boyama 19
KOH testi 20
Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi 20
Katalaz testi 20
Oksidaz testi 20
Elde Edilen İzolatların Gıda Güvenliği Açısından İncelenmesi 21
Hemolitik aktivite 21
Antibiyotik duyarlılığı 21
Antibakteriyel aktivite 21
Biyofilm oluşumu 22
Biyojenik aminlerin üretimi 22
LAB İzolatlarının Probiyotik Analizi 22
Düşük pH'a dayanıklılık 22
Simüle edilmiş mide ve bağırsak sıvısına karşı direnç 22
Safra tuzuna karşı direnç 23
Etanol (C_2H_6O) toleransı 23
Otolitik aktivite 23
Hücre yüzeyi hidrofobisite testi 23
Laktik Asit Bakterilerinin Teknolojik Özellikleri 24
Asitleştirme yeteneği 24
Antioksidan aktivite 24
Kültür ortamında kolesterol asimilasyonu 24
Proteolitik aktivite 25
Lipolitik aktivite 25
β-glukosidaz aktivitesi 25
Esteraz aktivitesi 26
Pektinaz aktivitesi 26

Lipaz aktivitesi 26
Seçilen İzolatların Moleküler Yöntemlerle Tanılanması 26
Genomik DNA izolasyonu 26
Seçilen izolatların biyojen amin üretme yeteneğinin spesifik PCR ile belirlenmesi 27
16S rRNA PCR İşlemi ve PCR Döngüsü 28
16S rRNA PCR elektroforez işlemi 28
Kompetent hücrenin hazırlanması 29
Ligasyon işlemi 29
Transformasyon ve koloni seçimi 29
Koloni PCR için hazırlık ve PCR REAKSİYONU 30
Plazmit izolasyonu, kontrol edilmesi ve konsantrasyonlarının ölçülmesi 30
DNA dizi analiz sonuçlarının değerlendirilmesi ve filogenetik ağaç çizimi 30
ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 31
Bakteri İzolasyonu 31
Örneklerin toplanması ve laktik asit bakteri izolasyonu 31
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Fenotipik ve Morfolojik Karakterizasyonunun Belirlenmesi 31
Laktik Asit Bakterilerin Gıda Güvenliği Açısından Değerlendirilmesi 32
Laktik asit bakterilerinin hemolitik aktivitelerinin belirlenmesi 32
Antibiyotik direnci sonuçları 32
Antibakteriyel aktivite 34
Biyofilm oluşumu 35
Biyojen aminlerin üretimi 36
Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi 38
Düşük pH direnci 38
Gastrointestinal sistem koşullarına karşı direnç 39
Safra tuzuna karşı dirençlerinin belirlenmesi 41
Etanol toleransı 42
Otolitik aktivite 43
Hücre yüzeyi hidrofobisitesi 44
Laktik Asit Bakterilerinin Teknolojik Özelliklerin Değerlendirilmesi 45
Laktik asit bakterilerinin asitleştirme yeteneğinin belirlenmesi 45
Laktik asit bakterilerinin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi 47
Kolestrol asimilasyonu 48
LAB izolatların proteolitik, lipolitik ve jelatinaz aktivitesi 50

Diğer enzim aktiviteleri....50
Konvensiyonel ve biyokimyasal testler....52
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Moleküler İdentifikasyonu....52
İzolatların 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılması....52
16S rRNA gen bölgesinin klonlanması....53
16S rRNA sekans analizi....54
Filo genetik ağaç....54
SONUÇLAR VE ÖNERİLER....56
KAYNAKÇA....58
ÖZGEÇMİŞ....64

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Bazı Fermente Gıda Ürünlerinde Bulunan LAB Türleri 3
Tablo 2. Kullanılan Kimyasallar, Besiyerleri ve Kitler 15
Tablo 3. Tez Dahilinde Kullanılan Cihazlar 17
Tablo 4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı 18
Tablo 5. BA Oluşumu ve Degradasyonunda Yer Alan Genleri Amplifiye Etmek İçin Kullanılan PCR Primerleri ve PCR Koşullar 27
Tablo 6. PCR'ın Hazırlanışı ve PCR Döngüsü 28
Tablo 7. Koloni PCR Protokolü 30
Tablo 8. LAB İzolatlarının Antibiyotik Direnç Sonuçları (R: Dirençli; I: orta düzey direnç; S: Duyarlı) 33
Tablo 9. LAB İzolatlarının Disk Difüzyon Test Sonuçları 34
Tablo 10. LAB İzolatlarının GIS Deney Sonuçları 40
Tablo 11. İzolatların Gen Bank Numarası 54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. A) Homofermantatif metabolizma (Embden-Meyerhof-Parnas yolağı); B) Heterofermentatif metabolizma şematik gösterimi 4
Şekil 2. Probiyotik LAB sınıflandırılması 6
Şekil 3. Ev yapımı şarap örneklerinden izole edilen bazı LAB'lerin petri görüntüleri 31
Şekil 4. A. boş oksidaz kiti; B. NK 4 izolatına ait oksidaz negatif test sonucu; C. NK 4 izolatına ait katalaz pozitif test sonucu 32
Şekil 5. A. Pozitif kontrol olarak seçilen *S. aureus*' a ait β-hemolitik aktivite görüntüsü; B. NK 12 izolatına ait γ-hemolitik aktivite görüntüsü 32
Şekil 6. Farklı LAB izolatlarının farklı antibiyotiklere karşı antibiyotik duyarlılık görüntüsü 33
Şekil 7. LAB izolatlarının disk difüzyon test görüntüleri 35
Şekil 8. A. Biyofilm pozitif olan *S.aureus* ATCC 25923 standart suşu; B. LAB izolatlarının biyofilm negatif suşları görüntüleri 36
Şekil 9. A. Biyojen amin üretimi negatif izolat; B. Biyojen amin üretimi pozitif izolat 37
Şekil 10. LAB İzolatlarının pH 2'de gelişim değerleri 39
Şekil 11. A. NK28 suşuna ait GİS petri görüntüsü; B. NK32 suşuna ait GİS petri görüntüsü 40
Şekil 12. LAB izolatlarının safra tuzuna karşı direnç sonuçları 41
Şekil 13. LAB izolatlarının etanol toleransı değerleri 43
Şekil 14. LAB izolatlarının otolitik aktivitesi sonuçları 44
Şekil 15. LAB izolatlarının hidrofobisite testi sonuçları 45
Şekil 16. LAB izolatların asitleştirme yeteneği sonuçları 47
Şekil 17. LAB izolatlarının antioksidan aktivitesi sonuçları 48
Şekil 18. LAB izolatlarının kolesterol asimilasyonu sonuçları 49
Şekil 19. LAB izolatlarının proteolitik aktivitesi görüntüleri 51
Şekil 20. A. NK12 izolatına ait API 20E görüntüsü; B. NK12 izolatına ait API ZYM görüntüsü; C. NK12 izolatına ait API 50 CH görüntüsü 52
Şekil 21. NK5, NK12 ve NK25 izolatlarına ait 16S rRNA görüntüsü 53
Şekil 22. Mavi beyaz koloni petri görüntüsü 53
Şekil 23. İzolatların koloni PCR görüntüsü 54
Şekil 24. LAB potansiyeli olan izolatlara ait 16S rRNA temelli filogenetik ağaç 55

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	**:** Santigrat Derece
µg	**:** Mikrogram
µl	**:** Mikrolitre
AO	**:** Amin Oksidaz
BA	**:** Biyojen Amin
BLAST	**:** Basic Local Alingment Search Tool
$CaCl_2$	**:** Kalsiyumklorür
CO_2	**:** Karbondioksit
DNA	**:** Deoksiriboz Nükleik Asit
EDTA	**:** Etilendiamintetraasetik asit
EFSA	**:** Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi TABLOLAR DİZİNİ
EtBr	**:** Etidyum Bromür
FDA	**:** Gıda ve İlaç Dairesi
H_2O_2	**:** Hidrogen Peroksit
HCl	**:** Hidrogen Klorür
HİS	**:** Histamin
IPTG	**:** İzopropil - D-tiyogalaktosid
KOH	**:** Potasyum Hidroksit
LAB	**:** Laktik Asit Bakteriya
LB	**:** Luria broth
MRS	**:** De Man – Rogosa – Sharpe Agar
NA	**:** Nurient Agar
NaCl	**:** Sodyum Klorür
PCR	**:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	**:** Ribonükleik Asit
TAE	**:** Tris-asetat-EDTA

GİRİŞ

İnsan sağlığı ile mikrobiyota arasındaki ilişkinin anlaşılmasına yönelik çalışmalar giderek artmaktadır. Özellikle gastrointestinal sistemde (GİS) yer alan yararlı mikroorganizmaların beslenme, bağışıklık sistemi, metabolik süreçler ve hastalık gelişimi üzerindeki etkileri bilimsel açıdan büyük önem kazanmaktadır. Bu bağlamda, probiyotik mikroorganizmalar, bilimsel çalışmalarda yoğun ilgi görmüştür. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) probiyotikleri, "yeterli miktarda alındığında konakçıya sağlık açısından yarar sağlayan canlı mikroorganizmalar" olarak tanımlamaktadır. Laktik asit bakterileri (LAB), probiyotik özellik gösteren mikroorganizmaların başında gelmekte olup, özellikle fermantasyon teknolojileri ve fonksiyonel gıdalar alanında geniş uygulama alanına sahiptir (Shah *et al.* 2024).

LAB'ler, Gram pozitif, genellikle çubuk ya da kok şeklinde olan, katalaz negatif, fakültatif anaerobik özellikte bakterilerdir. Bu bakteriler yaygın olarak süt, meyve, sebze, et, balık, turşu, çay ve şarap gibi çeşitli fermente ürünlerde doğal olarak bulunabilmektedirler (DİE *et al.* 2024). LAB'ler gıdalarda asidifikasyon sağlayarak, mikrobiyal stabiliteyi artırmaktadır. Aynı zamanda aroma, tat ve doku gibi duyusal özelliklerin gelişimine katkıda bulunmaktadır. Ancak son yıllarda, geleneksel kullanım alanlarının ötesinde, LAB'lerin insan sağlığı üzerindeki potansiyel etkileri araştırma konusu olmuş ve özellikle alternatif kaynaklardan izole edilen suşların probiyotik potansiyelleri değerlendirilmeye başlanmıştır (Bintsis *et al.* 2018).

Şarap, zengin mikrobiyal çeşitliliğe sahip bir fermantasyon ürünüdür. Alkolik ve malolaktik fermantasyon (MLF) süreçleri sırasında maya ve bakteriler doğal olarak gelişmekte ve bu süreçler, şarabın kimyasal bileşimi ile duyusal özelliklerini şekillendirmektedir. MLF, LAB tarafından gerçekleştirilir. Bu süreçte şarap içeriğinde bulunan LAB'lerin biyojen amin (BA) üretimi, antioksidan kapasite, antimikrobiyal aktivite gibi fonksiyonel özellikleri dikkat çekmektedir. Bununla birlikte, şarap kaynaklı LAB suşlarının probiyotik olarak kullanılabilirliği hakkında yapılan çalışmalar sınırlıdır. Özellikle ekstrem çevre koşullarına (düşük pH, yüksek alkol konsantrasyonu) adaptasyon yeteneği yüksek olan bu suşların, insan GİS'teki zorlu koşullarda da hayatta kalma potansiyeli bulunduğu düşünülmektedir (García-Ruiz *et al.* 2024).

Yapılan tez çalışmasında, şaraptan izole edilen LAB'lerinin probiyotik ve teknolojik özellikleri araştırıldı. İlk olarak, şarap örneklerinden LAB'ler izole edilerek, ardından elde edilen izolatların fenotipik ve biyokimyasal özellikleri belirlendi. İzolatlar asit, safra toleransı,

otolitik kapasite, antibakteriyel etki, antibiyotik direnci, enzimatik aktivite, yüzeye tutunma gibi temel probiyotik ve teknolojik kriterler açısından değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda istenilen parametrelere uyan izolatlar seçilerek, moleküler yöntemlerle tür düzeyinde tanımlama yapıldı ve filogenetik analizlerle izolatların taksonomik konumları belirlendi.

Çalışmanın amacı; şaraptan izole edilen LAB suşlarının probiyotik ve teknolojik potansiyelini ortaya koyarak, gelecekte fonksiyonel gıda veya biyoteknolojik uygulamalarda değerlendirilme potansiyelini belirlemektir. Bu yönüyle çalışma hem mikrobiyal çeşitliliğin anlaşılması hem de alternatif probiyotik kaynaklarının tanımlanması açısından literatüre katkı sağlamayı hedeflemektedir.

KURAMSAL TEMELLER

Laktik Asit Bakterileri

LAB'ler, *Lactobacillales* takımında, düşük Guanin+Sitozin (G+C) içeriğine sahip, basil veya kok biçiminde, Gram pozitif, spor oluşturmayan *(Sporolactobacillus inulinus* hariç), hareketsiz mikroorganizmalardır (Hatti-Kaul *et al.* 2018; Xie *et al.* 2024).

LAB'ler fermentatif metabolizma yoluyla laktik asit üretirken, pH'yı düşürerek ortamı asidik hale getirmektedir. Bu bakteriler nitratı indirgeyemez. Ayrıca büyümeleri için glikoz ve amonyum tuzlarının yanı sıra belirli vitamin ve amino asitlere de ihtiyaç duyarlar (Hatti-Kaul *et al.* 2018; Marchwińska and Gwiazdowska *et al.* 2022).

Genellikle mikroaerofilik veya anaerobik koşullarda yaşayan, fermente gıdalarda, toprakta, bitkilerde ve memelilerin sindirim sisteminde bulunan, ekstrem şartlara (sıcaklık, tuz, pH) uyum sağlayan LAB'ler gıda, sağlık ve biyoteknoloji alanlarında yapılan uygulamalarda sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Tablo 1'de bazı fermente gıdalarda bulunan LAB türleri gösterilmektedir (Bintsis *et al.* 2018; Liu *et al.* 2020).

Tablo 1. Bazı Fermente Gıda Ürünlerinde Bulunan LAB Türleri

Laktik Asit Bakteri Türü	**Fermente Ürün**
Lactobacillus	Yoğurt, peynir, turşu, ekmek
Streptococcus	Süt ve yoğurt
Enterococcus	Sucuk, salam, lahana turşusu, süt ve yoğurt
Weissella	Turşu
Oenococcus	Şarap
Carnobacterium	Fermente et ve balık ürünleri
Pediococcus	Bira ve şarap
Lactococcus	Peynir ve tereyağı
Leuconostoc	Konserve gıdalarda

LAB'ler sahip oldukları çeşitli metabolik yolaklar sayesinde başta laktik asit olmak üzere pek çok organik asidin sentezinden sorumludur. Bu metabolik aktiviteler yalnızca asidik ortam oluşturarak mikrobiyal stabiliteyi artırmakla kalmaz, aynı zamanda fermente gıdaların lezzet, aroma ve tekstürel özelliklerinin gelişiminde de doğrudan rol oynar. Böylece LAB'ler, hem gıda güvenliğine hem de duyusal kaliteye katkı sağlayan önemli mikrobiyal ajanlar olarak öne çıkar.

LAB'lerin laktik asit üretimi, aldolaz enziminin rol alıp almamasına göre homolaktik ve heterolaktik fermantasyon olmak üzere iki ana gruba ayrılır (Şekil 1). *Lactococcus* ve *Lactobacillus* cinsleri genellikle homolaktik fermantasyon gerçekleştirirken, *Leuconostoc, Weissella* ve *Oenococcus* cinsleri heterolaktik fermantasyon yolağını kullanır (Wang *et al.* 2021).

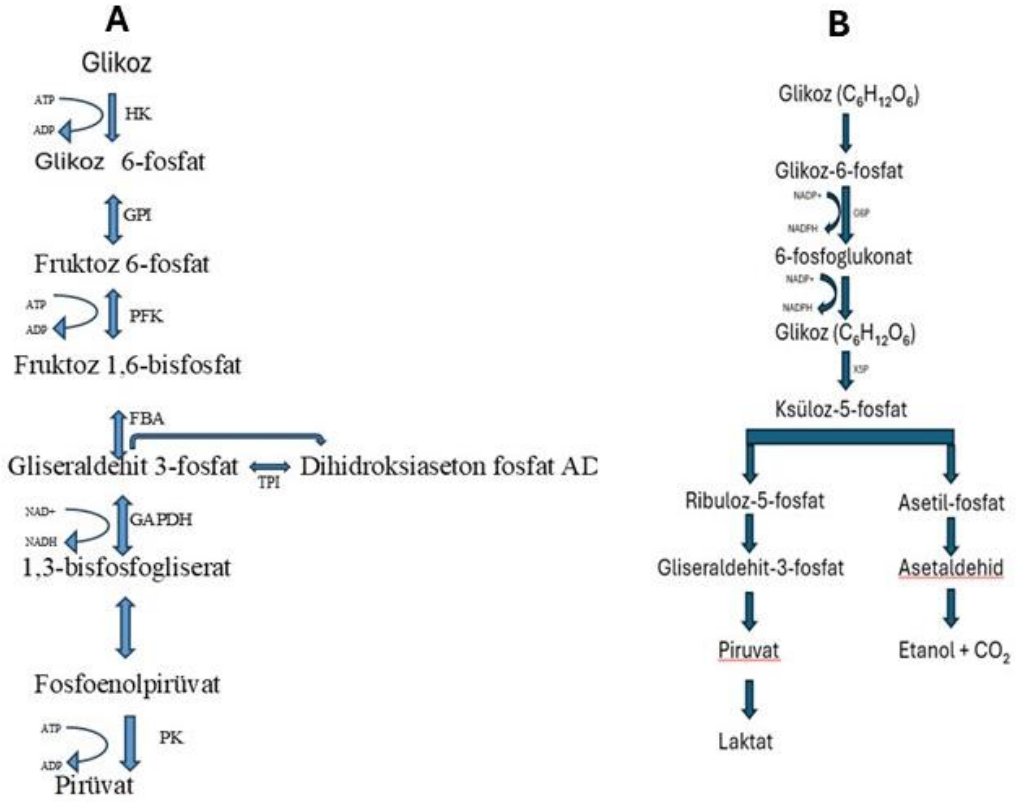
LAB;

- Homolaktik fermantasyon sürecinde, karbon kaynağı olarak glikoz kullanmakta; glikoliz yoluyla elde edilen pirüvat, laktat dehidrogenaz enziminin katalizörlüğünde laktik aside indirgenmektedir.

$$\text{Glikoz} + 2P + 2ADP \rightarrow 2\text{Laktat} + 2ATP + H_2O$$

- Heterolaktik fermantasyon sürecinde ise, glikozu, fosfoketolaz (PK) enzimi aracılığıyla laktik asit, etanol ve karbondioksite (örneğin Leuconostoc türlerinde) dönüştürmektedir (Eiteman *et al.* 2015).

$$\text{Glikoz} + 2NADP^+ + P + 2\ ADP \rightarrow \text{Laktat} + \text{Asetat} + CO_2 + 2NADPH + 2ATP + H_2O$$



Şekil 1. A) Homofermantatif metabolizma (Embden-Meyerhof-Parnas yolağı); B) Heterofermentatif metabolizma şematik gösterimi (Stincone *et al.* 2015; Bintsis *et al.* 2018; Yagi Wang *et al.* 2021; Suissa *et al.* 2022)

Şarapta Bulunan Laktik Asit Bakterileri

Şarap, üzümün doğal mikroflorası veya ilave edilen mikroorganizmalar aracılığıyla gerçekleştirilen fermantasyon süreci sonucunda elde edilen ve dünya genelinde en çok tüketilen fermente içeceklerden biridir. Şarap üretiminde kullanılan üzümler üzerinde, hem bağda yetişme sürecinde hem de hasat sonrası dönemde yapılan mikrobiyolojik analizlerde, maya, küf ve bakteri gibi çeşitli mikroorganizmaların varlığı saptanmıştır. Bu mikrobiyal çeşitliliğin; üzümün yetiştiği çevresel koşullar, toprak yapısı, iklimsel değişkenlik, uygulanan tarımsal pratikler (örneğin gübreleme) gibi birçok faktöre bağlı olarak değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Dolayısıyla, üzümün mikrobiyal ekosistemi, şarabın fermantasyon sürecini ve nihai ürünün kalitesini doğrudan etkileyen temel unsurlardan biri olarak değerlendirilmektedir. (Bartle *et al.* 2019).

Şarap fermantasyonu, alkolik ve MLF olmak üzere iki aşamada gerçekleşir. Fermantasyon süreci, şarabın aromasını, tadını ve dokusunu etkileyen en önemli faktörlerden biridir (Wibowo *et al.* 1985). Alkolik fermantasyonda, mayalar şıradaki şekeri (fruktoz ve glikoz) etanol ve karbondioksite dönüştürür. Bu işlem, şaraba alkol içeriğini kazandırır ve fermantasyonun en hızlı aşamasıdır. MLF ise LAB şaraptaki malik asiti laktik aside dönüştürür. MLF, şarabın asitliğini azaltarak daha olgun ve hoş bir tat alınmasını sağlar (Virdis *et al.* 2021). Üzüm vinifikasyonundaki bu iki önemli reaksiyonun yanı sıra, üzüm suyunun şaraba dönüşümünü tamamlamak için LAB'ler; ester, β- glukosidaz, pektinaz, asetaldehit ve diasetil gibi aromatik bileşikleri oluştururlar. Bu bileşikler sayesinde şarabın bozulmasına neden olabilecek zararlı mikroorganizmaların gelişimini engelleyerek, içeriğinin daha dolgun, pürüzsüz bir hal almasını ve şarabın raf ömrünün uzamasını sağlarlar (García-Ruiz *et al.* 2008; Bokulich *et al.* 2016; Cappello *et al.* 2017).

Şarap üretimi ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiği zaman *Lactobacillus oeni, Lactoplantibacillus plantarum, Lactobacillus brevis, Lactobacillus Buchneri, Lactobacillus Hilgardii, Pediococcus Damnosus, Pediococcus parvulus, Pediococcus Pentosaceus, Pediococcus inopinatus, Oenococcus alcoholitolerans ve Oenococcus kitaharae* suşlarına sıklıkla rastlanmaktadır (Cappello *et al.* 2017; Virdis *et al.* 2021).

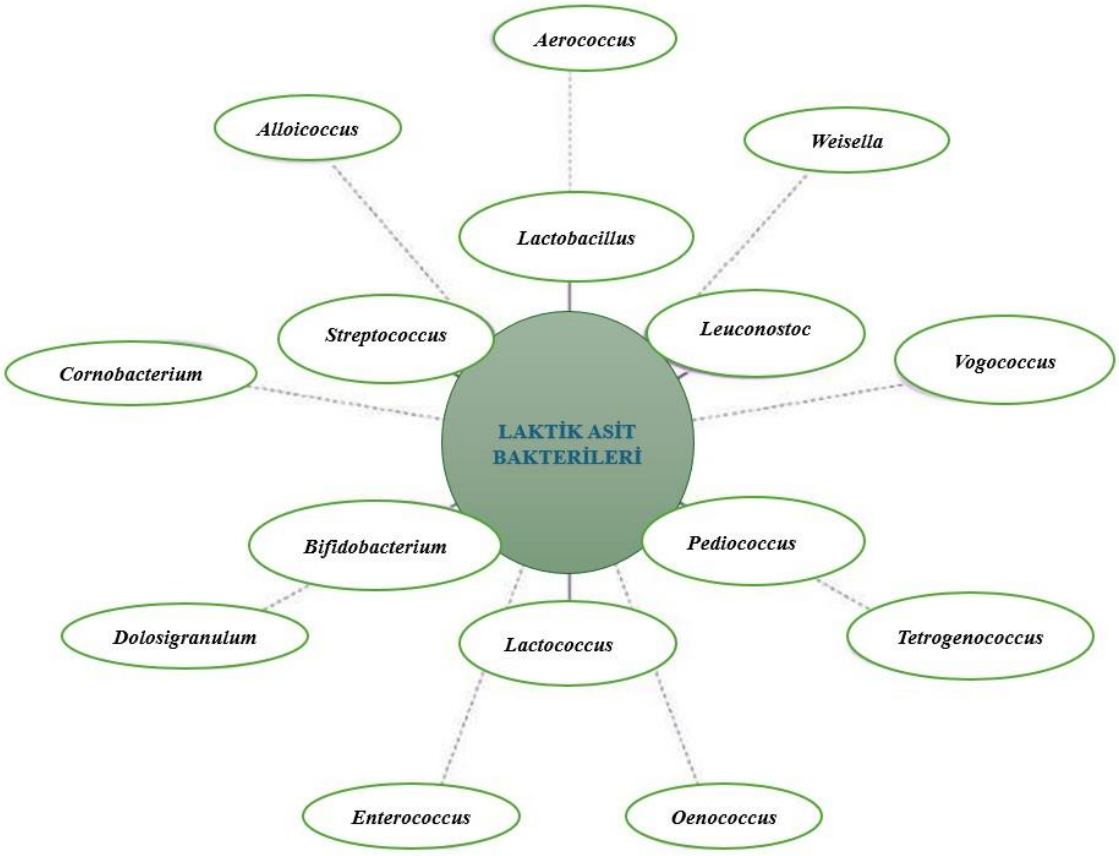
Probiyotikler

Probiyotikler, yeterli miktarda alındıklarında konakçının sağlığı üzerinde faydalı etkiler gösteren canlı mikroorganizmalardır. Genellikle bağırsak mikrobiyotasını dengeleyerek, GİS sağlığını desteklerler. Yalnızca tek bir mikroorganizma türünü içerebildiği gibi, sinerjik etki

amacıyla birden fazla türün bir araya getirildiği ‘çoklu probiyotikler’ veya ‘probiyotik karışımları’ olarak adlandırılabilirler (Krawczyk *et al.* 2021; Shah *et al.* 2024).

Lactobacillus, Bifidobacterium, Enterococcus, Leuconostoc, Pediococcus ve Streptococus cinsleri probiyotik olarak kullanılabilen mikroorganizmalar arasında yer almaktadır (Gossard *et al.* 2016). Son yapılan çalışmalarda *Akkermansia, Bacteroides, Christensenella, Faecalibacterium, Prevotella* ve *Roseburia* cinsleri de bu mikroorganizma sınıfına dahil edilmiştir (Sharma *et al.* 2025)(Şekil 2).

Probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmaların güvenilirliği büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından “Genel Olarak Güvenli Olarak Kabul Edilen” (GRAS) statüsünde değerlendirilmiştir. Özellikle *Lactobacillus* cinsine ait suşlar insan sağlığı açısından risk faktörü oluşturmamaktadır (Shah *et al.* 2024).



Şekil 2. Probiyotik LAB sınıflandırılması (Garbacz *et al.* 2022)

Düşük pH direnci

LAB’lerin mide ortamının düşük pH koşullarından geçerek bağırsak sistemine ulaşması, probiyotik olarak değerlendirilebilmesi için önemli parametrelerden biridir. Asidik ortamlar, LAB’lerin hücresel bütünlüğüne, metabolik aktivitesine ve canlılık düzeylerine etki ederek,

hücre zarını deformasyona uğratır, ATP üretimini azaltır ve hücre içi pH dengesine zarar gösterir (Xu *et al.* 2023). Bununla birlikte, bazı LAB türleri asidik ortamların oluşturduğu stres koşullarına karşı çeşitli adaptif mekanizmalar geliştirmiştir. Bu mekanizmalar arasında proton pompalama sistemleri, stres proteinlerinin (örneğin Hsp70) sentezi, hücre zarındaki lipid kompozisyonunun değiştirilmesi ve gen ekspresyon düzeyinde düzenlemeler yer almaktadır (Jan *et al.* 2024).

Simüle edilmiş mide ve bağırsak sıvısına karşı direnç

LAB'lerin en önemli probiyotik özelliklerinden biri de oral olarak alındıktan sonra GİS zorlu koşullarına (örneğin, mide asiditesi (pH 1.5–3.0)), safra tuzları, sindirim enzimleri (pepsin, tripsin ve peristaltik hareketler) karşı direnç göstererek canlı kalabilmesidir. GİS koşullarına karşı canlılığını sürdürebilen LAB suşları, mideden bağırsağa ulaştıktan sonra epitel hücrelerine tutunarak kolonize olabiliyorlar. Bu sayede, konakçıyla daha güçlü bir etkileşim kurarak bağışıklık sistemi modülasyonu, patojenlere karşı rekabet ve metabolik düzenleme gibi faydalı etkiler sağlayabilmektedir. Bu bağlamda, probiyotik ürün geliştirme süreçlerinde LAB'ler, GİS koşullarına dayanıklılığı, suş seçimi ve ürün formülasyonu açısından temel bir belirleyici unsur olarak öne çıkmaktadır. LAB'lerin GİS ortamına karşı gösterdiği direnç hem hücresel düzeydeki yapısal özelliklerine hem de stres yanıtı mekanizmalarına bağlıdır. Bazı LAB suşları, hücre duvarı kalınlığı, yüzey protein yapısı, ekzopolisakkarit üretimi ve zar lipid kompozisyonu gibi özellikleri sayesinde mide ve bağırsak koşullarında hayatta kalma yeteneği geliştirmiştir. Ayrıca bu bakterilerin asit ve safra tuzlarına karşı tolerans geliştirmeleri, sitoplazmik pH'ı düzenleyen antiport sistemleri, ATPaz aktivitesi ve stres proteinlerinin (örneğin DnaK, GroEL) indüksiyonu gibi moleküler adaptasyonlara dayanır (Zhang *et al.* 2020).

Safra direnci

Safra tuzları karaciğerde kolesterolün oksidasyonu sonucu sentezlenen, memelilerin safra kesesinde depolanarak ince bağırsağa salgılanan steroid yapılı asitlerdir. Safra tuzları, bağırsak mikrobiyotası üzerinde de düzenleyici etki gösterir; bazı mikrobiyal türlerin çoğalmasını baskılarken, bazılarının gelişimini destekleyebilir. Bu durum, GİS sağlığı ve sistemik inflamasyon üzerinde dolaylı etkiler oluşturabilir. LAB türlerinin yüksek konsantrasyondaki safra tuzlarına dayanıklılık göstermesi, özellikle ince bağırsakta canlılıklarını sürdürebilmeleri ve konakçı üzerinde yararlı etkilerini gösterebilmeleri açısından kritik öneme sahiptir. Safra tuzlarına tolerans, probiyotiklerin gastrointestinal geçiş sırasında hayatta kalmasını ve bağırsak mikrobiyotasına başarılı şekilde kolonize olmasını destekleyen

önemli bir özelliktir. Çünkü yüksek konsantrasyondaki safra tuzu, hücre zarının lipitlerine ve yağ asitlerine zarar vererek, hücre bütünlüğünün bozar ve LAB'lerin hayatta kalma şansı azaltır (Odu *et al.* 2021).

Hidrofobisite

Hücre yüzeyi hidrofobisitesi, mikroorganizmaların yüzeylere tutunma (adhezyon) yeteneğini belirleyen temel fizikokimyasal özelliklerden biridir. ve bu nedenle bakterilerin yüzey bağlanma, biyofilm oluşturma kapasitesi ve GİS'de mukozal yüzeylere bağlanma kapasitesi gibi çevresel koşullara karşı gösterdikleri direnç düzeyleri ile doğrudan ilişkilidir. Yüksek hidrofobisite düzeyine sahip LAB suşlarının konakçı bağırsak epitel hücrelerine adhezyon kabiliyeti daha yüksektir; bu da probiyotik etki göstermeleri açısından önemli bir avantajdır. Ayrıca bu özellik, LAB'lerin biyofilm oluşturma potansiyelini de etkileyerek gastrointestinal stabilitelerini artırabilir. Hücre yüzeyi hidrofobisitesi suşlar arasında değişiklik gösterir ve bu farklılıkların bakteri hücre yüzeyindeki kimyasal ve yapısal heterojenlikten kaynaklandığı belirtilmiştir (Shekarforoush *et al.* 2022). Yapılan deneylerde hidrofobsite kapasitesini gösterebilmek için; ksilen, kloroform, n-hekzadekan ve etil asetat gibi polar olmayan çözücüler kullanılmaktadır (Obisesan *et al.* 2024). Araştırmacılar; bu değişkenliğin hücre duvarında yer alan ara katman proteinleri, hidrofobik amino asitler, yüzey proteinleri, lipitler, polisakkaritler ve sitoplazmik zar proteinleri gibi biyomoleküler yapılardan etkilendiğini bildirmiştir. Ayrıca hücrelerin büyüme fazı, çevresel stres faktörleri ve pleomorfizm (hücre morfolojisindeki değişkenlik) gibi dinamik parametrelerin de hidrofobisite düzeylerini etkileyebileceği ifade edilmiştir (Guan *et al.* 2020; Bargezar *et al.* 2021).

Etanol toleransı

Etanol toleransı, LAB'lerin yüksek alkol miktarında hayatta kalma ve metabolik aktivitelerini sürdürebilme yeteneğini ifade eder. Etanol, bakteriyel hücre zarında yapısal bozulmalara, protein denatürasyonuna ve hücre içi enzimatik aktivitelerin baskılanmasına neden olabilir (García-Ruiz *et al.*, 2021). Ancak bazı LAB suşları, özellikle *Lactobacillus, Oenococcus* ve *Pediococcus* türleri, yüksek etanol konsantrasyonlarına dayanıklılık göstererek fermantasyon sürecinde aktif kalabilir. Etanol toleransı, özellikle şarap ve bira gibi yüksek alkollü fermente ürünlerde LAB'lerin canlılık düzeyini koruyabilmesi, istenilen fermantasyonun gerçekleşmesi açısından önemlidir. Etanolün zar geçirgenliğini artırıcı etkisine karşı, dayanıklı LAB suşları hücre zarlarını stabilize eden yağ asidi bileşimini değiştirerek ve stres proteinleri sentezleyerek bu olumsuz etkileri tolere edebilir. Bu özellik, aynı zamanda LAB'lerin probiyotik özelliklerinin korunmasında ve fonksiyonel gıda üretiminde sürekliliğin

sağlanmasında rol oynar. Etanole dayanıklı suşların seçimi, özellikle alkol içeren gıdalarda mikrobiyal stabilite ve ürün kalitesini artırmak amacıyla önem kazanmaktadır.

Otolitik aktivite

Otolitik aktivite LAB'ler için hem teknolojik kalite hem de sağlık yararları açısından önemli bir parametredir. Otolitik aktivite LAB'lerin kendi lizozomal enzimleriyle hücre yapısını parçalaması sürecidir. Bu süreç sonucunda serbest kalan enzimler, özellikle fermente ürünlerde aroma, tat ve yapı gelişimine katkı sağlar. LAB'lerin otolizi, aynı zamanda proteinlerin peptit ve amino asitlere dönüşümünü kolaylaştırarak ürünün biyofonksiyonel özelliklerini artırır. Ancak kontrolsüz otoliz, canlı probiyotik sayısının azalmasına yol açarak ürünün probiyotik etkinliğini sınırlayabilir (Chapot-Chartier *et al.* 2014).

Laktik Asit Bakterilerinin Teknolojik Özellikleri

Enzimatik Aktiviteler

LAB'lerin gerçekleştirdiği enzimatik etkileşimler; şarabın görünümüne, tadına, aromasına ve dokusuna etki ederek birtakım farklılıklar getirmektedir.

Esterazlar, organik asitlerin ester bağlarını hidrolizleyerek parçalayan enzimlerdir. Bu enzimler, özellikle bazı asit ve alkol türevleri arasındaki dengeyi düzenleyerek, çeşitli ester bileşiklerinin oluşumuna veya parçalanmasına aracılık ederler. Şarap üretim sürecinde esteraz enzimleri, aroma bileşiklerinin oluşumu ve dönüşümünde kilit rol oynamaktadır. Özellikle uçucu esterlerin sentezi yoluyla şarabın duyusal özelliklerini doğrudan etkileyebilmektedirler. Şarapta bulunan esterler, meyvemsi ve çiçeksi aromaların oluşumundan sorumlu başlıca bileşikler arasında yer alırlar; bu esterlerin türü ve konsantrasyonu, şarabın kalitesi ve tüketici tercihi açısından belirleyici faktörlerden biridir. Dolayısıyla, esteraz enzimlerinin aktivitesi, şarabın aroma profili üzerinde doğrudan etkili olabilmekte; bu nedenle teknolojik ve enolojik açıdan önemli bir parametre olarak değerlendirilmektedir (Moreira *et al.* 2024).

Glukozidazlar, glikozidik bağları hidrolize eden hidrolaz grubu enzimlerdir. Şekere bağlı aroma molekülleri, şarabın potansiyel aroma zenginliğini oluşturmaktadır ve bu moleküller, bir şeker (glikozidik molekül) ile uçucu bir aroma bileşeni (aglikon) arasındaki bağların glikozidaz enzimleri tarafından parçalanmasıyla serbest kalarak şaraba kendine özgü kokularını vermektedirler. Bu aroma öncüleri terpenler, C_{13} norisoprenoidler, uçucu fenoller ve C_6 bileşikleri gibi farklı türlerde olabilir. Farklı organizmalarda bulunan β-glukozidaz enzimleri, substrat özgüllüklerine göre farklılık gösterir; bu nedenle kullanılacak şeker molekülünün yapısı, hangi β-glukozidaz izoformunun tercih edileceğini belirleyen temel etkendir. Aroma molekülleri tek bir glikoz şekerine bağlanabileceği gibi, disakkarit adı verilen

iki şekerli yapılara da bağlanabilir. Aroma molekülü sadece bir glikoz şekerine bağlıysa, bu bağı kırmak için β-glukozidaz enzimi yeterlidir. Eğer aroma molekülü bir disakkarite bağlıysa, önce dıştaki ikinci şeker birimini (örneğin; arabinoz, ramnoz, ksilos veya apioz) parçalayacak bir ekzo-glikozidaz enzimine ihtiyaç duyulur. Ardından, geriye kalan glikoz şekerini ayırmak için bir β-glukozidaz enzimi devreye girmektedir. Özetle, şarabın potansiyel aromaları şeker moleküllerine bağlı halde bulunur ve bu aromaların açığa çıkması için farklı türlerdeki glikozidaz enzimlerinin spesifik olarak görev yapması gerekmektedir (Cappello *et al.* 2017).

Proteazlar, şarapta aroma ve lezzet oluşumunda rol oynayan diğer önemli enzim gruplarından biridir. Bu enzim grubu, amino asitler ve proteinler üzerinde etkili olmaktadır. Proteazlar süt mikroflorasında bulunan bakterilerde detaylı bir şekilde incelenmiş olsalar da şarapla ilişkili bakterilerin proteolitik aktiviteleri üzerine daha az çalışma yapılmıştır. Arjantin'den izole edilen bazı *O. oeni* suşlarında tanımlanan ekzoproteazların, kırmızı ve beyaz şaraplarda amino asitleri serbest hale getirdiği bilinmektedir. Bu enzimlerin üretimi bakterilerin gelişimine evrelerine göre değişiklik gösterir ve besin kıtlığı gibi stres koşulları altında artmaktadır (Rollán *et al.* 1995). Çeşitli şarap laktobasillerinde (*L. plantarum, L. paraplantarum, L. hilgardii* gibi) PrtP adlandırılan bir proteaz enziminin varlığı bildirilmiştir. Bu enzim bakterilerin büyümesinin yanı sıra, peptit bağlarından amino asitleri serbest bırakarak, şarap aromasına katkıda bulunmasına olanak sağlamaktadır. Bu durum, süt mikroflorasında bulunan bakterilerin enzimlerinin etkilerine benzetilmektedir (Mtshali *et al.* 2010). *O. oeni* PSU-1 suşunun genetik analizinde, PrtP benzeri bir hücre zarı proteazı veya belirgin bir sinyal peptidine sahip bir peptidaz geni bulunmuştur. Bu durum, bu suşta daha önce gözlemlenen proteaz aktivitesinin hangi enzimden kaynaklandığının belirlenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır (Rollán *et al.* 1993). Bu bilgiler, şarap mikroorganizmalarının şarabın aroma ve lezzet özelliklerinin şekillenmesinde şeker metabolizmasının yanı sıra, protein ve amino asitler üzerindeki enzimatik etkileşimlerinin de önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Gelecekteki araştırmalar, farklı şarap mikroorganizmalarındaki proteazların çeşitliliğini, aktivite mekanizmalarını ve şarap kalitesi üzerindeki spesifik etkilerini daha detaylı bir şekilde aydınlatabilir (Cappello *et al.* 2017).

Asitleştirme yeteneği

Çeşitli fermente gıda ürünlerinde bulunan LAB'lerin önemli özelliklerinden biri, asitleştirme yeteneğine sahip olmasıdır. Asit üretimi sonucunda pH değerinin düşmesi, üründe özel bir lezzet oluşturma, patojenik ve gıda bozulmasına sebebiyet veren bakterilerin ortamdan uzaklaştırılmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda ürünün güvenliği ve raf ömrü önemli ölçüde artmaktadır. Fermente ürünlerde pH değerinin hızla inmesi istenmeyen bir durumdur;

bu durum, ürünün dokusunda ve kalitesinde olumsuz değişikliklere sebebiyet verebilir. (Ma *et al.* 2012; Tilocca *et al.* 2020).

Antioksidan aktivite

Antioksidanlar, biyolojik sistemlerde serbest radikaller olarak bilinen reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve reaktif azot türlerinin (RNS) neden olduğu oksidatif stresi önleyen veya geciktiren moleküllerdir. Serbest radikaller, hücresel metabolizma ve enerji üretimi gibi biyolojik süreçlerin doğal bir yan ürünü olarak oluşan reaktif oksijen türleridir. Bu moleküller, eksik olan elektronlarını tamamlamak amacıyla çevresindeki moleküllerle reaksiyona girerek hücresel yapılara zarar veren, hücresel fonksiyonların bozulmasına neden olan oksidatif stresi oluştururlar. Oksidatif stresin uzun süreli etkileri sonucunda, vücutta hücre zarının bütünlüğünde, DNA ve proteinlerin yapısında hasarlar meydana gelmektedir (Jing Su *et al.* 2015).

Bu zararlı etkileri önlemede antioksidan bileşikler önemli rol oynamaktadır. Antioksidanlar, serbest radikalleri nötralize ederek onların hücre bileşenlerine zarar vermesini engeller. Bu bileşikler doğal olarak meyve, sebze, kuruyemiş ve bazı tıbbi bitkilerde yüksek oranda bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar LAB'de belirli antioksidan özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. LAB'lerin ürettiği enzimler ve metabolitler aracılığıyla serbest radikallerin etkisiz hale getirildiği, böylece hücrelerin oksidatif strese karşı korunmasına katkı sağladığı bildirilmektedir (Nemzer *et al.* 2021; Çoşkun *et al.* 2022).

Kolestrol asimilasyonu

Kolesterol, hücre duvarı biyosentezi ve hormon üretimini destekleyen, insan vücudunda doğal olarak bulunan sterol bir birleşimdir. Vücutta ihtiyaç duyulan kolesterolün yaklaşık %80'i karaciğer ve intestinal mukozada de novo (endojen) olarak sentezlenmekte olup, sadece %20'si dışarıdan (ekzojen) diyet yoluyla alınmaktadır (Yang *et al.* 2020). Geçmişten günümüze kadar yüksek serum kolesterol düzeylerinin kontrolünde en yaygın tercih edilen yöntem, düşük yağ içerikli diyet programlarının uygulanması olmuştur. Ancak bu diyetlerin uzun vadede sürdürülebilir olmaması, bireylerin yaşam kalitesini olumsuz etkileyebilmekte ve alternatif yaklaşımların gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu bağlamda, probiyotik mikroorganizmalar, özellikle de LAB, kolesterol metabolizmasını olumlu yönde etkileyen biyofonksiyonel özellikleriyle dikkat çekmektedir (Ahire *et al.* 2012; Anila *et al.* 2016).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda araştırmacılar, bazı LAB suşlarının çöktürme veya safra tuzlarını hidrolize ederek kolesterol emilimini azaltma gibi çeşitli mekanizmalarla lipit metabolizmasına etki edebildiğini ortaya koymuştur (Munir *et al.* 2022; Nurcahyanı *et al.*

2023). Bu etki, probiyotiklerin fonksiyonel gıda gruplarında kullanım potansiyelini daha da artırmaktadır. Bu çerçevede, fermente bir içecek olan ve üretim maliyeti görece düşük olan şarap, içeriğinde doğal olarak LAB suşları barındırması nedeniyle bilimsel açıdan önem arz etmektedir. Şarap üretimi sırasında ortaya çıkan spontan MLF süreci, LAB'lerin gelişmesini desteklemekte ve böylece bu bakterilerin potansiyel kolesterol düşürücü etkilerinden faydalanılabilmektedir (Fossi *et al.* 2022).

Laktik Asit Bakterilerinde Gıda Güvenliği

Hemolitik aktivite

Bazı mikroorganizmalarda bulunan hemolitik aktivite, konak canlılarda bulunan eritrositleri hemolizin adı verilen enzim ile parçalamaktadır. Bunun sonucunda birey de hücrelere yetersiz oksijen taşınması sonucunda hayati risk taşıyan hastalıklara neden olmaktadır. Gama (γ)-hemolitik mikroorganizmalar da genellikle kanlı agar plakalarındaki kırmızı kan hücrelerini (RBC'ler) yok eden bir bileşik olan hemolizini üretemediği için bakteri etrafında zon oluşturmazlar (Sohail *et al.* 2021). Hemolizinin yokluğu, test edilen suşlarda fırsatçı virülansın ortaya çıkmayacağını garanti eder. Hemolitik aktivite gibi, virülans faktörlerin LAB izolatlarının gıdalarda ve farmasötiklerde probiyotik olarak kullanılmasından önce incelenmesi gereklidir.

Antibiyotik duyarlılığı

LAB, bazı antibiyotiklere doğal olarak dirençli olması normaldir ve genellikle sorun teşkil etmez. Ancak bu direnç genetik olarak taşınabilir ve diğer bakterilere yatay gen transferi ile aktarılabilir nitelikteyse, bu büyük bir risk oluşturmaktadır. Gıda ve sağlık güvenliği açısından bu durumda kullanımı istenmez. Antibiyotik direnci testlerinde bir mikroorganizmanın birden fazla antibiyotiğe karşı geliştirdiği direnç düzeyini belirlemek için MAR indeksi (Multiple Antibiotic Resistance Index) kullanılır. MAR indeksi, bir mikroorganizmanın test edildiği antibiyotiklerden kaç tanesine dirençli olduğunu gösterir. Antibiyotik direncinin bazı suşlarda doğal (intrinsik) olduğu kabul edilebilirken, mobil genler üzerinden yatay gen transferi riski taşıyan direnç özellikleri özellikle istenmez. Bu durum, gıda sektöründe kullanılacak probiyotiklerin seçimi açısından önemli bir güvenlik kriteridir.

Antibakteriyel aktivite

LAB'lerin gıda güvenliği açısından antibakteriyel aktivite göstermesi önemli unsurlardan biridir. Bu özellikleri sayesinde gıdalarda ve bağırsak sisteminde bulunan patojen bakterilerin büyümesini engelleyebilirler. LAB'ler büyüme sırasında ürettikleri organik asitler,

hidrojen peroksit, diasetil, etanol, fenoller ve protein bileşikleri gibi metabolitler sayesinde antibakteriyel etki gösterirler. Probiyotik bakteriler tarafından üretildiği bildirilen en yaygın antibakteriyel bileşikler arasında bakteriyosinler, hidrojen peroksit ve organik asitler (özellikle laktik ve asetik asitler) bulunur. Bu metabolitlerin varlığında LAB besinler için tehlike arz eden bakterilerle rekabet ederek vücuttaki patojenlerin kolonizasyonunu engelleyebilir.

Biyojen amin

BA'lar şarap ve diğer fermente ürünlerde bulunabilen ve potansiyel sağlık riskleri taşıyan bileşiklerdir. Şaraptaki BA'ların temel kaynağı LAB metabolizmasıdır. MLF sırasında en çok oluşan BA'lar histamin, putresin ve tiramindir. Bu BA'lar, LAB'lerde bulunan histidin dekarboksilaz (hdc), ornitin dekarboksilaz (odc) ve tirozin dekarboksilaz (tdc) enzimlerinin aktivitesiyle, sırasıyla histidin, ornitin ve tirozin öncüllerinden oluşmaktadır. Bu enzimleri kodlayan genlerin varlığı ve enzimatik aktivite suşa özgü olarak farklılık göstermektedir. Bazı LAB cinsleri, agmatin deiminaz enzimi aracılığıyla agmatin (agdi) öncülünden de putresin üretmektedir.

Bu bilgiler, şarap üretiminde kullanılan LAB türlerinin ve suşlarının seçiminin, şarabın son BA içeriği üzerinde önemli bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir. Şarap üreticileri için, BA oluşumunu en aza indirecek LAB suşlarını tercih etmek ve üretim süreçlerini kontrol altında tutmak, ürün güvenliği açısından kritik öneme sahiptir.

BA çeşitlerinden birisi olan Histamin, tüketiciler tarafından yüksek oranda vücuda alındığında Histamin toksisitesi meydana gelmektedir. Bunun sonucunda kişilerde; baş ağrısı, çarpıntı, kusma, ishal ve hipertansif krizler, yüz, boyun ve üst kollarda kızarma, ağızda uyuşma ve/veya yanma, metalik tat, baş ağrısı, kaşıntılı döküntü, kalp çarpıntısı, astım atakları, kurdeşen, gastrointestinal sorunlar ve yutma güçlüğü gibi semptomlar gözlemlenmektedir. Kadaverin ve putresin şarabın duyusal özelliklerinin bozulmasına ve bunun sonucunda metalik, etli veya çürük bir aroma oluşmasına neden olmaktadır. Tiramin, gıda zehirlenmesine, bunun sonucunda ise migren, mide bulantısı, kusma, solunum bozukluklarına neden olur. Feniletilamin ve triptamin zehirlenmesi sonucunda; baş ağrısı, migren ve yüksek tansiyon oluşabilir. Putresin ve kadaverinin toksik etkisi azdır, ancak yüksek konsantrasyonları detoksifikasyon enzimleriyle etkileşime girmesi ile histamin ve tiraminin toksik etkilerini artırabilmektedir (Virdis *et al.* 2021, Moreira *et al.* 2024).

Biyofilm

Biyofilm, bakterilerin yüzeye tutunması, hücreler arası iletişim (quorum sensing) ve hücre dışı matriks üretimi gibi ardışık biyolojik süreçlerle oluşan, hücre dışı polimerik

maddelerle çevrili, organize ve karmaşık mikrobiyal toplulukdur. Bu yapılar, çevresel stres faktörlerine karşı mikroorganizmaların dirençlerini artırarak, canlılığını sürdürebilmesine fırsat tanımaktadır. LAB açısından biyofilm oluşturma yeteneği, probiyotik potansiyellerinin değerlendirilmesinde önemli bir kriter olarak kabul edilmektedir. Biyofilm formundaki LAB'ler, GİS yüzeylerine daha etkin bir şekilde tutunabilir, bu da onların bağırsakta daha uzun süre kalmasına ve konakçı üzerinde yararlı etkilerini sürdürebilmesine olanak tanır. Ayrıca biyofilm yapısı, safra tuzları, düşük pH, sindirim enzimleri gibi zararlı etkenlere karşı koruyucu bir mikro çevre oluşturarak, LAB'lerin hayatta kalma oranını artırmaktadır. Bu bağlamda, LAB suşlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri, onların fonksiyonel gıda bileşeni veya probiyotik olarak kullanılabilirliğini belirlemede önemli bir parametre olarak değerlendirilmektedir.

Biyofilm oluşumu, probiyotiklerin konak mukozasında koruyucu bir bariyer oluşturmasına olanak tanıyarak, patojen mikroorganizmaların adezyonunu ve kolonizasyonunu engellemektedir. Bu durum, probiyotiklerin rekabetçi dışlama mekanizması yoluyla konak savunmasına katkı sunduğunu ortaya koymaktadır. Bunun yanın sıra meydana gelen biyofilm, gıda endüstrisinde bazı sorunlara yol açmaktadır. Örneğin; gıda yüzeyinde meydana gelen biyofilm oluşumu, patojen mikroorganizmaların yüzeye tutunmasına olanak sağlar ve bunun sonucunda ürünün bozulmasına sebebiyet verir. Bunların yanı sıra bağırsak mikroflorasında oluşturulan biyofilm, patojenlerin tutunmasına neden olduğu için antibiyotik direncinin artmasına neden olmaktadır (Kubota *et al.* 2008; Pannella *et al.* 2020).

MATERYAL VE METOT

Kullanılan Malzemeler

Tablo 2. Kullanılan Kimyasallar, Besiyerleri ve Kitler

KİMYASAL ADI	FİRMA
Distile Su	Sigma-Aldrich
DNA Marker	Sigma-Aldrich
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich
Etidyum Bromür (EtBr)	Sigma-Aldrich
dNTP	Sigma-Aldrich
6X Yükleme Tamponu	Sigma-Aldrich
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich
Sodyum Klorür (NaCI)	Sigma-Aldrich
Kristal Violet	Sigma-Aldrich
Lügol	Sigma-Aldrich
Etanol	Sigma-Aldrich
Safranin	Sigma-Aldrich
Potasyum Hidroksit (KOH)	Sigma-Aldrich
Malaşit Yeşili	Sigma-Aldrich
İmmersiyon Yağı	Sigma-Aldrich
Oksidaz Test Kit	Sigma-Aldrich
Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	Sigma-Aldrich
Glikoz	Sigma-Aldrich
Pepsin	Roche
Pankreatin	Roche
Safra Tuzu (Oxgall)	Sigma-Aldrich
Laktoz	Sigma-Aldrich
Kolesterol (C4951)	Sigma-Aldrich
o-Ftalaldehit	Sigma-Aldrich
Asetik Asit	Sigma-Aldrich
Sülfürik Asit	Sigma-Aldrich
Agaroz	Sigma-Aldrich
Blank disk	Liofilchem
Amoxicillin (AML) disk	Liofilchem
Chloramphenicol (C30) disk	Liofilchem

Tablo 2. (devamı)

Ciprofloxacin (CIP) disk	Liofilchem
Kanamycin (K) disk	Liofilchem
Ofloxacin (OFX) disk	Liofilchem
Ampicillin (AMP) disk	Liofilchem
Sefaperazone (SFP) disk	Liofilchem
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich
Lizozim	Sigma-Aldrich
TAE Buffer	Sigma-Aldrich
Kalsiyum Klorür ($CaCI_2$)	Sigma-Aldrich
5-Bhromo-4-Choloro-3-Indolylβ-D-Galactopyranoside (Xgal)	Sigma-Aldrich
Isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG)	Sigma-Aldrich
Amfisilin	Sigma-Aldrich
Bromokrezol Moru	Yerli
Chloroform	Carlo Erba
D(+)-Glucose,Anhydrous	AFG
Glyceryltributyrate	Liofilchem
Histidinmonohidroklorür	Tekkım
İzopropilalchol (2-Propanol)	Tekkım
L-Lysinemonohydrocholorlde	Bldpharm
Kalsiyum Klorür Dihidrat	Tekkım
L-Ornithinehydrochlor|	Sigma
L-Tyrosinedisodiumsalt	Acros
Ammonium İron(ıı ı)Cıtrate	Carl Roth
Anaero-Anaeropack 2,5LT	Neogen
B-Arbutin	Bldpharm
Bacterlologlcal Peptone	Condolab
Beef Extract	Condolab
Blendmastermixwith7.5MM	Solis Bio
Phosphate Buffered Saline (PBS Tablet)	AFG
MRS Agar	Neogen
MRS Broth	Neogen
M17 Agar	Condolab
M17 Broth	Liofilchem
Tributyrin Agar	Hımedıa
Nutrient Agar	Sigma-Aldrich
Nutrient Broth	Sigma-Aldrich
LB Agar	Sigma-Aldrich

Tablo 2. (devamı)

LB Broth	Sigma-Aldrich
TSA (Tryptic Soy Agar)	Sigma-Aldrich
TSB (Tryptic Soy Broth)	Sigma-Aldrich
Blood Agar	Sigma-Aldrich
PDA (Potato Dextrose Agar)	Sigma-Aldrich
PDB (Potato Dextrose Broth)	Sigma-Aldrich
API 50 CHL Kit	BioMérieux
API 20 E Kit	BioMérieux
APİ ZYM Kit	BioMérieux
WizhardR Genomic DNA Purification Kit	Promega
Wizard R Plus SV Minipreps DNA Purification Systems	Promega
PGEM-T-Easy Vector system	Promega

Kullanılan Materyaller ve Cihazlar

Tablo 3. Tez Dahilinde Kullanılan Cihazlar

MATERYAL VE CİHAZ	**FİRMA**
İnkübatör	Thermo
Çalkalamalı inkübatör	Zhicheng- ZHWY2102C
Santrifüj	Hettich Mikro 220 R
Çalkalamalı Su Banyosu	Memmert WNB14
Mikroskobik Görüntüleme Sistemi	Leica – Samsung
Otoklav	Hirayama
Saf Su Cihazı	mpMiniPure DestUp
UV – Spektrofotometre	Beckman Coulter DU -730
Nanodrop	Thermo – MultiscanGo
PCR Cihazı	Senso Quest- Labcycler
Jel Görüntüleme Sistemi	VILBER LOURMAT Quatum
pH Metre	Mettler Toledo- SevenCompact
Hassas Terazi	Shimadzu – ATX 224
Kar Makinası	Scotsman – AF80
Mikropipet Takımı	Eppendorf
Steril kabin	Telstar Bio-II-A
Vorteks	Wisemix VM-10
Çoklu Blok Isıtıcısı	Lab-Line
Buzdolabı (+4°C)	Uğur
Çeker Ocak	Tolkim

Tablo 3. (devamı)

Derin Dondurucu (-20°C)	Vestel FT 280, Siemens
Derin Dondurucu (-86°C)	New Brunwick Premium U410
15 mL ve 50 mL'lik Santrifüj Tüpleri	Labsolute/Isolab
PCR Tüpleri	Labsolute/Isolab
Pipet Uçları	Isolab
1,5 ve 3 mL'lik Kuvars Küvetler	Merck
1,5-2 mL'lik Tüpler ve Raklar	Eppendorf

Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı

Tablo 4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

ÇÖZELTİ ADI	İÇERİK
%0,9'luk NaCI Çözeltisi	9 g NaCl tartılıp, 100 ml saf suda çözüldü.
Lügol Solüsyonu	1 g iyot ve 2 g KCl tartılıp, son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.
Safranin Solüsyonu	1 g safranin %96 EtOH'da çözünülüp, üzerine 100 ml saf su eklendi.
Kristal Violet Solüsyonu	2 g kristal violet %96 EtOH' da çözünülüp, üzerine 100 ml saf su eklendi.
KOH Solüsyonu	3 g KOH tartılıp, 100 ml saf suda çözüldü ve otoklavlandı.
50 mM EDTA Solüsyonu	1,46 g EDTA tartılıp 100 mL suda çözdürüldü ve pH'sı 8'e tamamlandı.
%70'lik EtOH	70 mL EtOH, 30 mL distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
1X TAE Tamponu	100 ml 10X TAE'den alınıp, hacmi 1000 ml ye tamamlandı.
$CaCl_2$ Solüsyonu	100 mM olacak şekilde saf su ile hazırlandı ve ağzı pamukla kapatılarak otoklavlandı.
Amfisilin Solüsyonu	20 mg/ml olacak şekilde steril saf su ile hazırlandı.
X- Gal Solüsyonu	40 mg/ml olacak şekilde dimetil formamid ile hazırlandı.
IPTG Solüsyonu	23,8 mg/ml olacak şekilde steril saf su ile hazırlandı.

Çalışmada Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması

LB Agar: 25 g LB Agar tartma işlemi sonrası 1000 mL'lik saf su içerisinde çözdürülerek otoklavlanma işleminden geçirildi.

LB Broth: 20 g LB Broth tartma işlemi sonrası 1000 mL'lik saf su içerisinde çözdürülerek otoklavlanma işleminden geçirildi.

MRS Agar: 66 g MRS agar tartma işlemi sonrası 1000 mL'lik saf su içerisinde çözdürülerek otoklavlanma işleminden geçirildi.

MRS Broth: 50 g MRS Broth tartma işlemi sonrası 1000 mL'lik saf su içerisinde çözdürülerek otoklavlanma işleminden geçirildi.

Tryptone Soya Agar (TSA): 40 g besiyeri 1000 mL saf su içerisinde çözdürülerek otoklavlanma işleminden geçirildi.

Tryptone Soya Broth (TSB): 30 g besiyeri 1000 mL saf su içerisinde çözdürülerek otoklavlanma işleminden geçirildi.

Bakteri İzolasyonu

Örneklerin toplanması

Tez kapsamında yapılan bakteri izolasyonu için kaynak olarak Azerbaycan'ın farklı yörelerinden (Oğuz, Şeki, Kabala) toplanan kırmızı ve beyaz şarap örnekleri kullanıldı. Temin edilen numuneler aseptik koşullar altında laboratuvar ortamına getirildi ve izolasyon çalışmalarına başlandı.

Laktik asit bakterilerinin izolasyonu

Her örnekten 1 mL alınarak ,9 mL'lik steril fizyolojik su (0.85% NaCl) içine alınarak, on kat seri dilüsyon yapıldı. Daha sonra, her seyreltmeden 0,1 mL alınarak steril MRS ve M17 agarına yayma ekim yapıldı. MRS agar'da gelişen bakteriler 37°C'de anaerobik olarak, M17 agarda gelişen bakteriler ise 30°C'de 48 saat'lik inkübasyona bırakıldı. Saf koloniler elde etmek için hücre ve koloni morfolojisi açısından farklı olduğu düşünülen her bir izolat alınarak MRS ve M17 agara çizgi ekimleri yapıldı. Ekimleri yapılan örnekler gelişim gösterdikleri sıcaklıklarda (30°C ve 37°C) 48 saat'lik inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonrası gelişen bakterilerin uzun süreli korunması için 2-3 öze dolusu mikroorganizma alınarak %15'lik gliserol ile takviye edilmiş MRS ve M17 broth sıvı besiyerine konulmuştur. Son olarak stok kültürler kullanılıncaya kadar -86 °C'de muhafaza edildi (Adıgüzel, 2008; Bennani *et al.* 2017).

Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Fenotipik ve Morfolojik Karakterizasyonu

İzolasyon aşamasında elde edilen tüm izolatların LAB olup olmadığını belirlemek için çeşitli konvensiyonel testlere tabi tutuldu. Bu amaçla tüm izolatların petri görüntüleri incelenerek, tipik görünüme sahip koloniler, LAB olabilme ihtimali yüksek izolatlar olarak seçildi ve bu kapsamda seçilen izolatlarında Gram özelliklerine, oksidaz ve katalaz enzim varlıklarına bakıldı.

Gram boyama

Bakteri kültürü, steril bir öze ile alınarak bir lam üzerine yayılıp 1 dakika boyunca kristal viyole ile muamele edildi. Kristal viyole ile muamele edildikten sonra fazla boya miktarının uzaklaştırılması distile su yardımıyla yıkaması yapıldı ve preparatın fiksasyonu için lügol

eklenerek 1 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası preparat, %96'lık etanol ile yıkaması yapıldı. Son olarak safranin ile 20 saniye muamele edilerek ve bu işlemin ardından yıkama yapılarak preparatlar kurumaya bırakılır. Mikroskop altında mor renkli olan hücrelerin Gram pozitif, pembe-kırmızı renkli hücrelerin ise Gram negatif bakteriler olduğu değerlendirilmektedir (Adıgüzel, 2008).

KOH testi

İzolatların Gram özelliklerini doğrulamak için ek olarak KOH (Potasyum Hidroksit) testi yapıldı ve bakteriler %3'lük KOH ile muamele edildi. Gram negatif bakterilerin duvarları ince olduğu için çekirdek ve sitoplazma bu işlem sırasında dışarı çıkmakta ve sümüksü bir yapı oluşturmaktadır. Ancak Gram pozitif bakterilerin hücre yapılarını bozamadığı için böyle bir oluşum gözlenemez. KOH testi için, M17 ve MRS agar'da büyütülen 1-2 günlük kültürlerden bir öze dolusu bakteri örneği alınarak, KOH solüsyonu ile 5 ve 8 saniye arasında muamele edildi. Özeyi preparat üzerinde hareket ettirirken, Gram pozitif bakterilerin herhangi birinde uzama oluşmazken, Gram negatif bakterilerde ise uzayan bir yapının oluştuğu gözlemlendi (Baltacı. 2016).

Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Katalaz testi

Test için, %5'lik H_2O_2 damlatılan lam üzerine canlandırılan suşlardan 1 öze dolusu alınarak, yerleştirildi ve yavaşça karıştırma işlemi yapıldı. Ardından kabarcık oluşturan bakteriler katalaz enzimi yönünden pozitif olurken oluşturmayan bakteriler ise, katalaz enzimi yönünden negatif kabul edildi (Choi *et al.* 2011).

Oksidaz testi

Oksidaz testi ile bakterilerdeki elektron taşınmasında görev alan sitokrom c proteinini, taşıyıp taşımadığı kontrol edilmektedir. Sitokrom c proteini, mitokondride bulunan ve solunumla ilgili bir transmembran proteinidir. Oksidaz testi için Kovács reaktifi kullanıldı ve bunun için kitte bulunan diskin üzerine su damlatılarak diskin yüzeyine bir miktar bakteri alındı. Oksidaz pozitif bakterilerde mavi ve mor renk oluşumu beklenirken, negatif bakterilerde ise herhangi bir renk değişimi olmayacaktır (Choi *et al.* 2011).

Elde Edilen İzolatların Gıda Güvenliği Açısından İncelenmesi

Hemolitik aktivite

Elde edilen izolatlar, MRS broth içerisinde 37°C'de 15 saat boyunca inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonrası %5 koyun kanı ile muamele edilen Tryptic Soy Agar (TSA) petrilerine yayma ekim yöntemi ile ekim yapıldı. Ekim yapılan petriler, yeniden 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edildi. Süre sonunda; hemolitik aktivite bakteriyel kolonilerin etrafında meydana gelen değişiklik ile belirlendi (Sohail *et al.* 2021).

Antibiyotik duyarlılığı

LAB'lere uygun olan antibiyotikler tercih edildi ve bu doğrultuda Amoxicillin 30 µg (AML), Sefaperazone 75 µg (CFP), Ciprofloxacin 5µg (CIP), Chloramphenical 30 µg (C), Ampicillin 10 µg (AMP), Ofloxacin 5 µg (OFX) ve Kanamisin 30 µg (K) antibiyotikler seçildi. Antibiyotik seçimi yapıldıktan sonra izolatlardan tek koloni alınarak eküvyon çubuğu yardımı ile MRS agar üzerine ekim yapıldı ve antibiyotik diskler petri yüzeyine bırakıldı. Daha sonra 37°C 'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı ve oluşan zon bölgeleri değerlendirildi (Barzegar *et al.* 2021).

Antibakteriyel aktivite

Antibakteriyel aktivite için disk difüzyon yöntemi kullanıldı. Bu amaçla *Escherichia coli* ATCC 43897, *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* RSKK 474, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778 ve *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 gibi gıda patojenleri kullanıldı. İlk olarak kullanılan patojen bakterilerin Nutrient Agar (NA) besiyerine ekimleri yapılıp ardından sıvı besiyerine aktarıldı ve 1 gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası elde edilen bakteriler, OD 600'de ölçümü yapıldı. Ölçüm sonucu OD600 nm ≈ 0,4 olacak şekilde fizyolojik suyla süspanse edilen solüsyondan 100µL alınarak petrilere eküvyon çubuğu yardımı ile ekim yapıldı. Pozitif kontrol olarak Gentamisin, negatif kontrol olarak ise steril distile su kullanıldı. Test edilecek olan LAB izolatlarının kültür örnekleri, fizyolojik su ile süspanse edilip her bir örnekten 10 µL alınarak boş disklere emdirildi. Son olarak hazırlanan petriler, 37°C'de 18 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası elde edilen zonların çapları ölçüldü. Deneyler 3'er tekerrür olacak şekilde gerçekleştirildi (Landeta *et al.* 2013).

Biyofilm oluşumu

Biyofilm oluşumu, Congo Kırmızı Agar (CRA) kullanılarak yapıldı. CRA besiyerinin bileşenleri; MRS broth (37 g/L), sakaroz (0,8 g/L), agar-agar (10 g/L) ve Congo Red boyasıdır (0,8 g/L). Congo Red boyası, konsantre sulu çözelti olarak hazırlanarak, ayrı ayrı otoklavlandı ve agar 55°C'ye soğuduğunda besiyerine eklendi. Besiyerine öze yardımıyla LAB izolatlarının ekimi yapıldı. Ekimi yapılmış plakalar 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Biyofilm pozitif suşlar siyah koloni, biyofilm negatif suşlar pembe/beyaz koloni meydana oluşturmasına göre belirlendi (Landeta *et al.* 2013).

Biyojenik aminlerin üretimi

Lab suşlarının amino asitlerin dekarboksilasyonu yoluyla BA üretme yeteneği, L-histidin mono hidroklorür, tirozin di-sodyum tuzu, L-ornitin mono hidroklorür ve L-lizin mono hidroklorür gibi öncül amino asitleri içeren bir besiyerinde analiz edildi. İlk olarak, izolatlar her öncül amino asitten %0,1 ve %0,005 piridoksal-5-fosfat içeren MRS broth'da iki kez alt kültüre alındı. Sonrasında, suşların %0,06 bromokrezol moru içeren amino asitli ve amino asitsiz MRS agarlara ekimi yapıldı. 2-5 günlük inkübasyondan sonra, kolonilerde elde edilen mor renk pozitif olarak kabul edildi (Adebo. 2020; Bargezar *et al.* 2021).

LAB İzolatlarının Probiyotik Analizi

Düşük pH'a dayanıklılık

LAB izolatları, anaerobik koşullar altında, 37°C'de 5 ml MRS broth'ta 18 ile 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında büyüyen bakteriler, 4°C'de 10 dakika boyunca 6.000 × g'de santrifüjlendi. Süpernatant kısmı atılarak, pelet üzerine PBS tamponu eklendi. Bu işlem iki kez tekrar edilerek yıkama işlemi yapıldı. Bu aşamadan sonra pH değerleri 2 ve 3'e ayarlanarak tekrar süspanse edildi. 37°C'de 0, 1, 2 ve 3 saat'lik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda, canlı hücre sayımı için seri dilüsyonlar hazırlanarak MRS agar plakalarına ekimi yapıldı. Bütün probiyotik deneylerde, niteliksel bir karşılaştırma yapmak için referans suş olarak *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 kullanıldı (Topçu *et al.* 2020).

Simüle edilmiş mide ve bağırsak sıvısına karşı direnç

Her bir izolat, 30 mL MRS broth ortamında 24 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından bakteriler 4°C'de 5 dakika boyunca 8.000 × g'de santrifüj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve pelet iki kez 10 mL PBS (pH = 6,5, 50 mM) ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından 3 mL PBS tamponunda yeniden süspanse edildi. Bakteri içeren her suşun (9 log CFU/Ml) bir mL'i, 9 mL simüle edilmiş gastrik sıvıya (NaCl 125 mM, KCl 7 mM, $NaHCO_3$ 45

mM, pepsin 3 g/L) (Sigma-Aldrich), pH = 2,5) eklendi ve 37°C'de 3 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda, süspansiyon 3.800 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi ve süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Pelet kısmı PBS ile yeniden yıkandı. Elde edilen süspansiyon, simüle edilmiş bağırsak sıvısında (%0,1 w/v pankreatin (Sigma-Aldrich), %0,15 w/v safra tuzu, pH=8,0) 37°C'de 3 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, canlı hücre sayımı için seri dilüsyonlar hazırlanarak MRS agar plakalarına ekimi yapıldı. (log CFU/ml) (Grimoud *et al.* 2010; Shukla ve Goyal, 2014; Bargezar *et al.* 2021).

Safra tuzuna karşı direnç

Her bir izolatın safra tuzuna direncini belirlemek için, tüm suşlar 0%, %0,5, %1,0, %1,5 ve %2,0 safra tuzu içeren MRS broth'a inoküle edildi. Kültürler 37°C'de 18 saat boyunca inkübasyona bırakıldı (Vasiee *et al.* 2018, Bargezar *et al.* 2021).

Etanol (C_2H_6O) toleransı

Etanol toleransı, %10, %15 ve %20 (V/V) etanol ve 100 mL pepton içeren MRS broth kullanılarak analiz edildi. İzolatların her biri hazırlanan ortama inoküle edildi ve 30 ºC'de 48 saatlik boyunca inkübasyona bırakıldı. Örneklerin büyümesi, inkübasyon öncesi ve sonrasındaki optik yoğunluktaki (OD600) değişikliklerle göre hesaplandı (Odu *et al.* 2021).

Otolitik aktivite

LAB suşları MRS broth içerisinde OD 600 nm'de 0,7-0,8 yoğunluğa ulaşana kadar inkübe edildi. Daha sonrasında 6,000 × g'de, 4°C, 15 dakikalık santrifüj işlemine tabi tutuldu. Peletler PBS tamponunda (20 Mm, pH 6,8) yıkandı ve aynı tamponda yeniden süspanse edilerek, oda sıcaklığında 4 saatlik inkübasyona bırakıldı. OD600nm 'de ölçülen değişiklikler kaydedildi (Ma *et al.* 2012)

Otolitik aktivite :$100 - (A1/A2) \times 100$

A_1 en düşük, A_2 en yüksek OD600 nm değeridir.

Hücre yüzeyi hidrofobisite testi

İzolatların hidrofobisitelerinin bir ölçüsü olarak polar olmayan çözücüde yapışma potansiyeli belirlendi. İzolatlar MRS broth'da 37°C'de 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası izolatlar 15 dakika boyunca 6.000 × g'de santrifüj edildi, süpernatant kısmı atıldı. İki kez PBS ile yıkanan pelet kısımları 600 nm'deki optik yoğunluk 0,6-0,7'ye (OD_0) ulaşana kadar PBS tamponunda yeniden süspanse edildi. Her örnekten 3 mL alınarak üzerine 1 mL n-heksadekan (Merck, Almanya) eklenip, oda sıcaklığında 15 dakikalık inkübasyona

bırakıldı. İnkübasyon süresi biten her tüp 3 dakika boyunca vortekslenerek, oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Daha sonra, süpernatantın absorbansı ölçüldü (OD600) (Jena et *et al.* 2013; Bargezar *et al.* 2021).

$$\text{Hidrofobisite } \% = [OD_0\text{-}OD/OD_0] \times 100$$

Laktik Asit Bakterilerinin Teknolojik Özellikleri

Asitleştirme yeteneği

İzolatlar MRS broth'da 37°C'de 18 saat boyunca inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonrası örnekler 6000 xg'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet üzerine steril ve soğuk PBS eklenerek yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işleminden sonra ortam da bulunan PBS uzaklaştırılarak, peletler 10 mL skim milk powder ile süspanse edildi. Sonrasında örnekler, 37°C'de 6 ile 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süreleri sonrasında pH metre ile ölçüm yapılarak sonuçlar kaydedildi. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki formülde yerine konularak asitleştirme yetenekleri kantitatif olarak ifade edildi (Barzegar *et al.* 2021; Odu *et al.* 2021).

$$\Delta pH = pH\ (6h \text{ ve } 24h) - pH\ (0h)$$

Antioksidan aktivite

Antioksidan aktivite deneyi, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal yakalama yöntemi ile yapıldı. İzolatlar MRS broth içerisine inoküle edildikten sonra 37°C'de 24 saatlik inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon süresi sonunda örnekler 6000 xg' de 10 dakika boyunca santrifüj işlemine tabi tutuldu. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatanttan 0.2 mL alınarak 2.8 mL DPPH solüsyonu ile muamele edilerek, karanlık ortamda 25°C'de 30 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Sonrasında örnekler santrifüjlenerek, OD 517 nm'de absorbansı ölçüldü ve elde edilen sonuçlar aşağıdaki formüle göre hesaplaması yapıldı (Barzegar *et al.* 2021).

$$\%DPPH^{+} = [1 - (A_{\text{örnek}} / A_{\text{kontrol}})] \times 100$$

Kültür ortamında kolesterol asimilasyonu

İzolatların her biri öncelikle MRS broth'da 37°C'de 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında örnekler 10 mL MRS sıvı besiyeri, %0,4 safra tuzu ve %1 asit kolesterol çözeltisi içeren ortama inoküle edilerek, 37°C'de yeniden 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra kültürler 5.000 rpm' de 4°C'de 10 dakika boyunca santrifüjlendi ve elde edilen süpernatant içeriğinde bulunan kolesterol miktarı spektrofotometrede 540 nm'de

okuması yapıldı edilen sonuçlar, kolesterol asimilasyon yüzdesi olarak aşağıdaki denkleme göre hesaplandı (Fossi *et al.* 2020; Fossi *et al.* 2022).

$$\% \text{ Kolesterol asimilasyonu} = [(C_0 - C)/Co] \times 100$$

Formüldeki C_0 kontrol, C ise örnekleri ifade eder.

Proteolitik aktivite

LAB izolatların proteolitik aktivitesini belirlemek için 2 farklı yöntem denendi

Jelatinaz testi

Jelatinaz üretimi, 10 g/L pepton ve 30 g/L jelatin içeren MRS agar ortamında belirlendi. İzolatlar 37 °C'de 16–18 saatlik inkübasyon sonrasında, 5 saat boyunca 4 °C' de bekletildi. Jelatinaz aktivitesi gösteren kolonilerin, etrafındaki zon çapına bakılarak değerlendirme yapıldı (Cariolato *et al.* 2008; Landeta *et al.* 2013).

Kalsiyum kazeinat agar testi

LAB suşlarının proteolitik aktivitesini belirlemek için ikinci yöntem olarak kalsiyum kazeinat agar testi kullanıldı. İzolatlar 37℃'de 18 ila 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Süpernatant kısmından 10 µL alınarak 6 mm genişliğindeki bir kuyuya yerleştirildi. Daha sonra, kuyucuk içerisine inoküle edilen örnekler 37℃'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Oluşan zon preotolitik aktivitenin olduğunu göstermektedir. Zon çapları (mm) olarak ölçümü yapıldı (Martin *et al.* 2006; Nespolo ve Brandelli *et al.* 2010; Landeta *et al.* 2013; Bargezar *et al.* 2021).

Lipolitik aktivite

LAB suşlarının lipolitik aktivitesini nitel olarak incelemek için, izolatların Tributyrin Agar'a (TA) (Merck, Almanya) çizgi ekimi yapıldı. Daha sonra, 37℃'de 48-72 saat inkübe edildi. Koloniler berrak bir halka ile çevrelendiğinde lipolitik aktivite pozitif olarak belirlendi (Nieto-Arribas *et al.* 2009; Bargezar *et al.* 2021).

β-glukosidaz aktivitesi

Arbutin (pH 5,6; %0,25) ile desteklenmiş MRS broth (%0,5 pepton, %1,0 beef exract, %2 agar) üzerinde β-glukosidaz aktivitesi belirlendi. Hazırlanan besiyeri ortamı otoklavlandı, daha sonra ortama 2 mL %1'lik ferrik amonyum sitrat çözeltisi eklenerek, petrilere döküldü. Bir gün +4℃'de bekletilen agarlar üzerine çizgi ekim yapıldıktan sonra, 30°C'de, 4-5 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda LAB kolonilerinin etrafında

kahverengi bir görünüm meydana gelirse β-glukosidaz aktivitesi bakımından pozitif olarak değerlendirildi (Razvan *et al.* 2022).

Esteraz aktivitesi

İzolatların esteraz aktivitesini belirlemek için substrat olarak %0,01 $CaCl_2$ ve %1,5 Tween 20 (pH 6,8) ile desteklenmiş modifiye MRS broth (%0,5 pepton, %0,5 beef ekstrakt, %0,5 yeast ekstrakt, %2 agar) kullanıldı. Esteraz aktivitesine sahip LAB, kolonilerin etrafında opak bir hale meydana gelmesi pozitif sonuç olarak kabul edildi. (Razvan *et al.* 2022).

Pektinaz aktivitesi

LAB'%0,5 elma pektini (pH 7,0) ile hazırlanan MRS broth ortamı (%1,0 glikoz ve %1,5 agar) üzerinde pektinaz aktivitesi belirlendi. Hazırlanan besiyeri ortamına bakterilerin ekimi yapılarak, inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda petrilere %1'lik heksadesiltrimetilamonyum bromür çözeltisi ilave edilerek, bakterilerin çizgi ekimi yapıldı ve kolonilerin etrafında oluşan zon pozitif sonuç olarak kabul edildi (Razvan *et al.* 2022).

Lipaz aktivitesi

İzolatların lipaz aktivitesini belirlemek için 10 mL/L %0,001 rodamin B çözeltisi ve 10 mL/L zeytinyağı içeren MRS broth (%0,5 pepton, %0,5 beef ekstraktı, %0,5 yeast ekstraktı ve %2 agar) modifiye besiyeri kullanıldı. İzolatlar 30 °C'de 3-5 gün inkübasyona bırakıldı ve inkübasyondan sonra petriler üzerinde oluşan zon pozitif sonuç olarak belirlendi (Razvan *et al.* 2022).

Enzimatik aktivitelerin tayini için API-ZYM kiti kullanıldı ve sonuçlar üretici endikasyonlarına göre yapıldı (bioMérieux).

Seçilen İzolatların Moleküler Yöntemlerle Tanılanması

Genomik DNA izolasyonu

DNA izolasyonu ve saflaştırılması, en iyi probiyotik ve teknolojik özellikler gösteren suşlar için yapıldı. Öncelikle saf olarak elde edilen izolatların, MRS agara çizgi ekimleri yapıldı ve 37°C' de anaerobik olarak 24 saat inkübe edildi. Gelişim gösteren izolatlardan alarak ve Wizard Genomic DNA Purification Kiti (A2360) kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirildi (Promega; USA). Ek olarak DNA örneğinin konsantrasyonunu ve saflığını ölçmek için NanoDrop 2000 ultra-mikrospektrofotometresi kullanıldı (Thermo Fisher Scientific; USA).

Seçilen izolatların biyojen amin üretme yeteneğinin spesifik PCR ile belirlenmesi

Biyojen amin üretim yetenekleri konvensiyonel olarak analiz edildikten sonra genomik olarak da aşağıdaki primerler kullanılarak tespit edilecektir (Tablo 5). (Fernández et al 2004; Fernández et al 2006; Landete et al 2007; Coton et al 2010)

Tablo 5. BA Oluşumu ve Degradasyonunda Yer Alan Genleri Amplifiye Etmek İçin Kullanılan PCR Primerleri ve PCR Koşullar

Enzim	Hedef gen	Primer adı	Sekans dizisi (5'-3')	Amplifikasyon boyu	Amplifikasyon programı
Histidin dekarboksilaz	*hdcA*	hdc1 hdc2	TTGACCGTATCTCAGTGAGTCCAT ACGGTCATACGAAACAATACCATC	174	95°C- 2 dk 95°C -35 sn 52°C -40 sn 72°C-30sn 72°C- 5 dk Toplam 35 döngü
Lizin dekarboksilaz	*cadA*	CadAf CadAr	GCTGGGTTCACTGCTGGA TGGCGTAATGTAGCTCATCA	220	95°C-2 dk 95°C-35 sn 54°C- 30 sn 72°C-30sn 72°C-5 dk Toplam 35 döngü
Lizin dekarboksilaz	*ldc*	Cad2f Cad2r	CAYRTNCCNGGNCAYAA GGDATNCCNGGNGGRTA	1185	95°C- 2 dk 95°C-35 sn 52°C- 30 sn 72°C- 60sn 72°C- 5 dk Toplam 35 döngü
Tirozin dekarboksilaz	*tdcA*	TDC1 TDC2	AACTATCGTATGGATATCAACG TAGTCAACCATATTGAAATCTGG	700	95°C-2 dk 95°C- 30 sn 50°C- 35 sn 72°C- 60sn 72°C- 5 dk Toplam 35 döngü
Ornitin dekarboksilaz	*odc*	ODC1 ODC2	NCAYAARCAACAAGYNGG GRTANGGNTNNGCACCTTC	830	95°C- 2 dk 95°C- 35 sn 54°C- 45 sn 72°C- 60sn 72°C- 5 dk Toplam 35 döngü

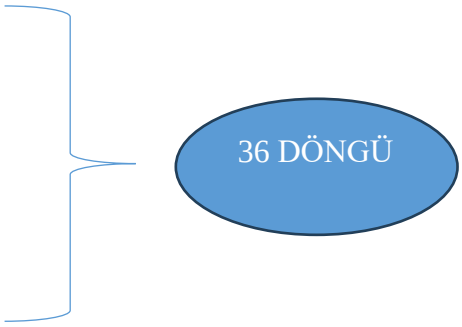
16S rRNA PCR İşlemi ve PCR Döngüsü

16S rRNA bölgesi bakterilerde korunaklı bir bölgedir ve dizi analiz karakterizasyonu çalışmaları için büyük önem taşımaktadır. İzolata ait 16S rRNA gen bölgesi, laboratuvar ortamında, evrensel primerler (27F (forward 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3; 1492R (reverse 5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3')) kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı. Bu doğrultuda reaksiyon tüpü totalde 30 µL'dir ve reaksiyon ortamının hazırlanışı Tablo 6'ta belirtildi. (Adıgüzel, 2008).

Tablo 6. PCR'ın Hazırlanışı ve PCR Döngüsü

Reaktif	Konstarasyon	Miktar (µl)
PCR buffer	10X	3
dNTP	25 mM	0,6
$MgCl_2$	25 mM	1,8
1492R	5 pmol	3
27F	5pmol	3
DMSO	%99	1,2
ddH_2O	-	14,1
Kalıp DNA	100 ng	5
Taq DNA Polimeraz	-	0,3

PCR Koşulları	Sıcaklık ve Süre
Ön denatürasyon	95 °C'de 5 dk
Denatürasyon	94°C'de 1 dk
Bağlanma	50°C'de 1 dk
Uzama	72°C'de 1 dk
Son uzama	72 °C' de 8 dk



16S rRNA PCR elektroforez işlemi

PCR işlemi ile çoğalan gen bölgesini doğrulamak için agaroz jel elektroforezi yapıldı. Bu amaçla 1 gram agaroz tartılıp, 100 mL 1X TAE ile karıştırıldı ve tamamen eriyene kadar mikrodalga fırında ısıtıldı. Ardından mikrodalgadan çıkarılan karışım, bir süre soğumaya bırakıldı ve soğuduktan sonra 3,5 µL Etüdyüm Bromür (EtBr) eklendi ve içinde tarağın takılı olduğu elektroforez küvetine yavaşça döküldü. Jel dondurulduktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı ve jel, 1X TAE içeren bir elektroforez kabına yerleştirildi. Ardından ilk kuyucuğa 4 µL marker ve diğer kuyucuklara 6X boyası ve PCR ürünü karışımından oluşan numuneler

yüklendi. Elektroforez jel sisteminin pozitif (+) ve negatif (-) kutup noktaları dikkatli bir şekilde uygun bölmelere takıldıktan sonra örnekler, 90 V'da 1 saat yürütüldü. Jel üzerinde bulunan ve etidyum bromür ile boyanan DNA bantları jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenip bilgisayar ortamında (Quantum Vilber Lournat Gel Documentation System) analiz edildi.

Kompetent hücrenin hazırlanması

İzolatlara ait 16S rRNA gen bölgeleri PCR ile amplifiye edildikten sonra sekans dizilerinin eldesi için, klonlama işlemi gerçekleştirildi. Bu amaçla, klonlamanın ilk basamağı olan kompetent hücre hazırlama aşamasına geçildi. *Escherichia coli* JM101 suşu stoktan canlandırıldı (3-4 faz ekim) ve gelişen kültürden tek bir koloni alınarak, içerisinde 4 ml LB broth bulunan 14 ml'lik tüpe inoküle edilerek, 37°C'de 1 gecelik inkübasyona bırakıldı. 300 µl kültürden alındı ve 2700 µl su ile seyreltilip spektrofotometede 600 nm dalga boyunda ölçümü yapıldı. Çıkan değer (Trüper and Schleifer) 10 ile çarpılır (seyreltme oranı). 3/zX10 formülü kullanılarak elde edilen rakam bize alınması gereken kültürü verir. Hesaplamadan çıkan değer kadar kültürden alınarak 30 ml LB broth üzerine eklendi ve 37°C'de 60 – 90 dk inkübasyona bırakıldı. Kültürün 40 dk'da OD600 ölçümü yapıldı ve 0,044-0,055'e ulaşıncaya kadar her 10 dk'da bir ölçüme devam edildi. Uygun değeri veren kültür 10 dk süre ile 4400 rpm'de santrifüjlendi. Daha sonra süpernatant kısmı dikkatlice uzaklaştırılarak, pelet üzerine soğuk 10 ml 100 mM $CaCl_2$ eklendi ve 30 – 45 dk süre ile buzda bekletildi. Süre sonunda yeniden karışım santrifüjlendi. Süpernatant kısmı dikkatlice uzaklaştırıldı, pelet üzerine soğuk 2 ml 100 mM CaCl2 eklenerek buzdolabında bir gün bekletildi.

Ligasyon işlemi

PCR ile amplifiye edilen 16S rRNA gen bölgeleri pGEM®-T Easy (Promega) vektörüne aktarıldı. Bu amaçla hazırlanan reaksiyon için kullanılan bileşenler aşağıda verilmiştir:

- 5 µl, 2X Ligasyon buffer
- 3 µl, PCR ürünü
- 1 µl vektör
- 1 µl T4 DNA ligaz

Yukarıdaki miktarlar 0,2 ml'lik tüplerde bir araya getirilerek karışım hazırlandı ve16°C'de 14 saat inkübasyona bırakıldı.

Transformasyon ve koloni seçimi

Transformasyon işlemi, ısı şok yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Isı şok yöntemi uygulamasından sonra elde edilen bakteriler, içerisinde X-gal, IPTG ve amfisilin bulunan LB

agar plaklarına yayma ekim yöntemiyle yayılarak, 37°C'de 12-14 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda petrilerde mavi beyaz tarama işlemi gerçekleştirildi. Beyaz koloniler genin insert olduğu pozitif koloniler olarak seçildi.

Koloni PCR için hazırlık ve PCR REAKSİYONU

Beyaz renkli koloniler pipet ucu yardımıyla seçilerek, hazırlanan PCR reaksiyon karışımına aktarıldı. Spesifik PCR için 14,1 µl ddH2O, 3 µl 10X PCR tamponu, 0,6 µl dNTP mix, 1,8 µl $MgCl_2$ (25mM), 3 µl 5 µM T7 primer, 3 µl 5µM SP6 primer, 0,3 µl Taq DNA polimeraz, 1,2 µl DMSO ve 3 µl kalıp DNA'dan oluşan 30 µl' lik PCR karışımı hazırlandı.

T7: (5'-AATACGACTCACTATAG–3')

SP6: (5'– ATTTAGGTGACACTATAG–3')

PCR işleminin gerçekleşebilmesi için uygun koşulları içeren PCR reaksiyonu hazırlandı. Elde edilen PCR ürünlerinin 4 µl si, %0,8 agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. PCR reaksiyonu için Tablo 7' deki PCR protokolü takip edildi.

Tablo 7. Koloni PCR Protokolü

Basamak	Sıcaklık (^{O}C)	Süre	Döngü sayısı
Ön Denatürasyon	94	10 dk	1
Denatürasyon	94	30 sn	35
Primer Bağlanma Basamağı	55	30 sn	
Primer Uzanma Basamağı	72	2 dk	

Plazmit izolasyonu, kontrol edilmesi ve konsantrasyonlarının ölçülmesi

Plazmit izolasyonu, Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, A1330) kiti ile, üretici firmanın protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Plazmitlerin konsantrasyonları Nanodrop cihazı (Thermo Scientific, Multiskan GO, USA) kullanılarak >100 µg/µl olacak şekilde ayarlandı.

DNA dizi analiz sonuçlarının değerlendirilmesi ve filogenetik ağaç çizimi

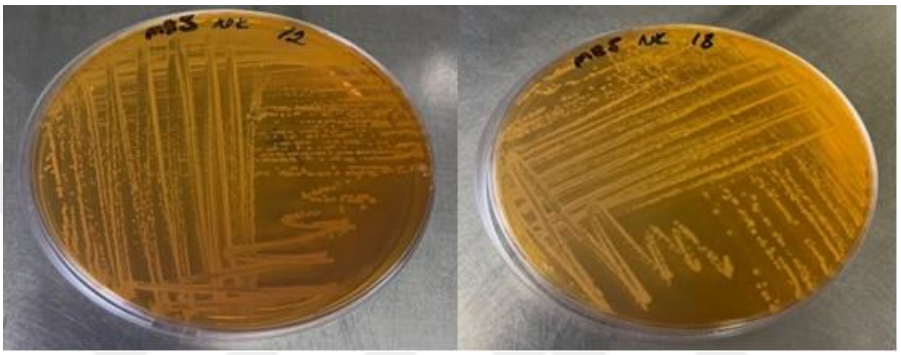
İzolatların 16S rRNA dizileri, NCBI veri tabanı (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) ve EzBioCloud'da (https://www.ezbiocloud.net) BLAST araç programı kullanılarak analiz edildi ve tanımlandı. MEGA11 yazılımında neighbour joining yazı yöntemi kullanılarak, en yakın akrabaları arasındaki evrimsel ilişkiyi analiz etmek için bir filogenetik ağaç oluşturuldu.

ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Bakteri İzolasyonu

Örneklerin toplanması ve laktik asit bakteri izolasyonu

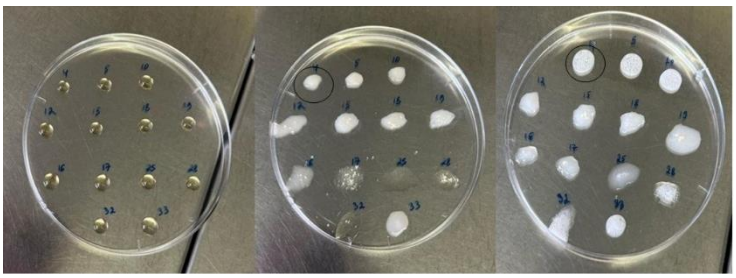
Azerbaycan'ın farklı bölgelerinden toplanan 20 adet ev yapımı şarap örneklerinden, 120 adet bakteri izolasyonu gerçekleştirildi (Şekil 3). İzolatların her biri 'NK' ile başlayan kod ile kodlandı ve kullanılıncaya kadar -86°C'de muhafaza edildi.



Şekil 3. Ev yapımı şarap örneklerinden izole edilen bazı LAB'lerin petri görüntüleri

Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Fenotipik ve Morfolojik Karakterizasyonunun Belirlenmesi

Tez çalışması kapsamında; probiyotik potansiyeli olan LAB'ler tespit edilebilmesi için öncelikle izole edilen bakteriler içerisinden LAB olma ihtimali yüksek olan izolatlar seçilerek toplamda 120 izolat çeşitli fenotipik testler kullanılarak karakterize edildi. Bu amaçla öncelikle koloni morfolojisine bakılarak tipik laktik asit bakterisi koloni morfolojisine sahip olan izolatlar seçildi. Daha sonra sırasıyla bu kolonilerin Gram özelliklerini belirlemek amacıyla Gram boyama ve KOH testi, endospor varlığını belirlemek amacıyla endospor boyama, Sitokrom C proteinini barındırıp barındırmadığını anlamak amacıyla oksidaz testi, katalaz enzimine sahip olup olmadığını anlamak için katalaz testleri yapıldı. Yapılan testler sonucunda 120 izolat arasından sadece 85'nin Gram pozitif, katalaz ve oksidaz negatif olduğu belirlenmiş, deneylere bu 85 izolat üzerinden devam edilmiştir. Bazı izolatların oksidaz ve katalaz testi sonuçları şekil 4'te gösterildi.

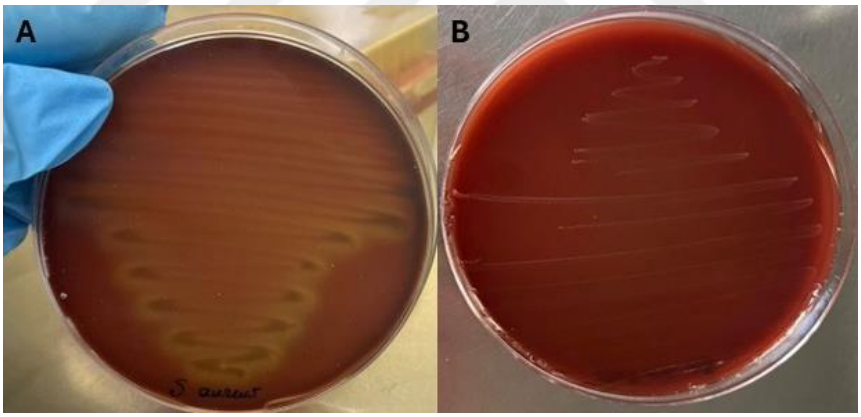


Şekil 4. A. boş oksidaz kiti; B. NK 4 izolatına ait oksidaz negatif test sonucu; C. NK 4 izolatına ait katalaz pozitif test sonucu

Laktik Asit Bakterilerin Gıda Güvenliği Açısından Değerlendirilmesi

Laktik asit bakterilerinin hemolitik aktivitelerinin belirlenmesi

LAB izolatları gösterdiği hemolitik aktivite kanlı agarda büyütüldüğünde kolonilerin etrafında oluşturduğu zonun şekline göre değerlendirildi. Fenotipik karakterizasyon sonucunda LAB olabileceği düşünülen 85 izolat üzerinde hemolitik aktivite deneyi yapıldı. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda izolatların 56'nin gama (γ)-hemolitik aktivite gösterdiği (yani hemolitik aktivite bulunmadığı) belirlendi (Şekil 5). Kalan 29 izolatta ise beta (β)-hemolitik aktivite gözlemlendi. Sonraki deneyler 56 bakteri üzerinde yapıldı.



Şekil 5. A. Pozitif kontrol olarak seçilen *S. aureus*' a ait β-hemolitik aktivite görüntüsü; B. NK 12 izolatına ait γ-hemolitik aktivite görüntüsü

Tiago Touret ve ark; lahana turşusundan LAB izole etmiş ve sonuç olarak suşlar γ-hemolitik aktivite göstermiştir (Tiago Touret *et al.* 2018). Reuben ve ark, yerel çiğ süt örneklerinden ve Katarzyna Garbacz ve ark, farklı fermente içecek ve gıdalardan LAB izole ederek, izolatların probiyotik özelliklerine bakmışlar. Sonuç olarak; hiçbir izolat hemolitik aktivite göstermemiştir (Reuben *et al.* 2020, Katarzyna Garbacz *et al.* 2021).

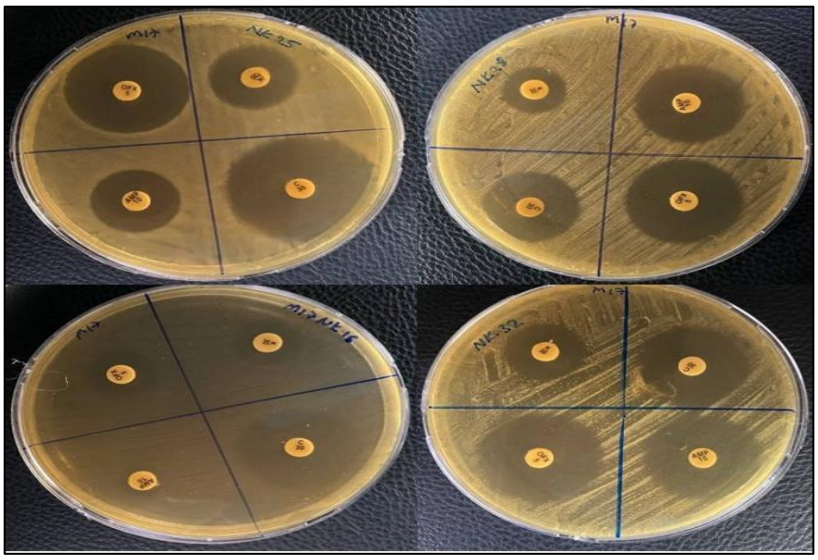
Antibiyotik direnci sonuçları

Yapılan çalışmalar farklı probiyotik suş türlerinde antibiyotik direncinin yaygın olduğunu ve bunun bir gıda güvenliği endişesi oluşturabileceğini göstermiştir. Bu nedenle, antibiyotik duyarlılığı probiyotiklerin değerlendirilmesinde güvenlik değerlendirmesinin

önemli bir parçası olarak düşünülmelidir. Tüm izolatlar ayrıca toplam 7 antibiyotiğe karşı disk difüzyon yöntemi kullanılarak antibiyotik duyarlılık testine tabi tutuldu. Çalışmada kullanılan antibiyotikler sırasıyla Amoxicillin (AML), Sefaperazone (S), Ciprofloxacin (CIP), Chloramphenical, Ampicillin (AMP), Ofloxacin (OFX) ve Kanamisin (K)'dir. İzolatların çoğunun en sık kullanılan antibiyotiklerin bazılarına karşı çoklu direnç gösterdiği bulundu. Bazı izolatların antibiyotik direnç sonuçları ve disk difüzyon test görüntüleri Tablo 8 ve şekil 6'da gösterildi.

Tablo 8. LAB İzolatlarının Antibiyotik Direnç Sonuçları (R: Dirençli; I: orta düzey direnç; S: Duyarlı)

İzolatlar	AML	C	CIP	CFP	AMP	OFX	K	MAR İndeksi
NK4	-	-	-	-	-	14mm (I)	-	0
NK 5	32 mm (S)	20 mm (I)	16 mm (I)	30 mm (S)	-	13mm (I)	-	0
NK10	-	-	16 mm (I)	-	-	-	-	0
NK 12	45 mm (S)	-	-	37 mm (S)	45mm (S)	-	-	0
NK 15	35 mm (S)	-	-	7 mm (R)	7 mm (R)	-	-	0,67
NK18	40 mm (S)	33 mm (S)	16 mm (I)	31 mm (S)	-	13mm (I)	-	0
NK 19	40 mm (S)	35 mm (S)	16 mm (I)	30 mm (S)	27 mm(S)	13mm (I)	-	0
NK 16	27 mm (S)	16 mm (I)	20 mm (I)	30 mm(S)	-	15mm (I)	15 mm (I)	0
NK 17	27 mm (S)	17 mm (I)	16 mm (I)	35 mm (S)	20mm (S)	13mm (I)	16 mm (I)	0
NK 25	27 mm (S)	37 mm (S)	31 mm (S)	41 mm (S)	22mm (S)	29mm S)	22mm (S)	0
NK 28	33 mm (S)	41 mm (S)	-	26 mm (S)	26 mm(S)	28 (S)	16 mm (I)	0
NK 32	36 mm (S)	55 mm (S)	35 mm (S)	27 mm (S)	28mm (S)	30mm S)	22mm (S)	0
NK 33	-	-	-	26mm (S)	-	-	-	0



Şekil 6. Farklı LAB izolatlarının farklı antibiyotiklere karşı antibiyotik duyarlılık görüntüsü

Sharma ve ark; yaptıkları çalışmada toplam 30 izolatın 45 antibiyotiğe karşı gösterdiği direnç testi yapılmıştır. Yapılan disk difüzyon yöntemi sonucunda izolatların çoğunun en sık kullanılan antibiyotiklerin bazılarına karşı direnç gösterdiği bulunmuştur (Sharma *et al.* 2016).

LAB'lerde antibiyotik duyarlılığının izole edildikleri kaynağa göre değiştiği gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmada fermente ürünlerden izole edilen *Lactobacillus* suşlarının, Kinolon antibiyotiklerine karşı duyarlı olduğu, insan kaynaklı izolatlarda ise (dışkı veya anne sütü) dirençli olduğu sonucuna varılmıştır. Gıda kaynaklı *Lactobacillus* suşlarının Siprofloksasin ve Gatifloksasine insan kaynaklı olanlardan daha duyarlı olduğu görülebilir (Duche *et al.* 2023).

Wang ve ark; yaptığı çalışmada ise Vankomisin ve Teikoplanine karşı izolatlar arasında yüksek düzeyde direnç gözlemlenmiştir (Wang *et al.* 2022). Jena ve ark; yaptığı çalışmada izole ettikleri tüm *Lactobacillus* suşlarının Vankomisin dışındaki antibiyotiklere duyarlı olduğu, Agostini ve ark; yaptığı çalışmada ise Vankomisine dirençli olduğu sonucuna varmışlar (Jena *et al.* 2013; Agostini *et al.* 2018).

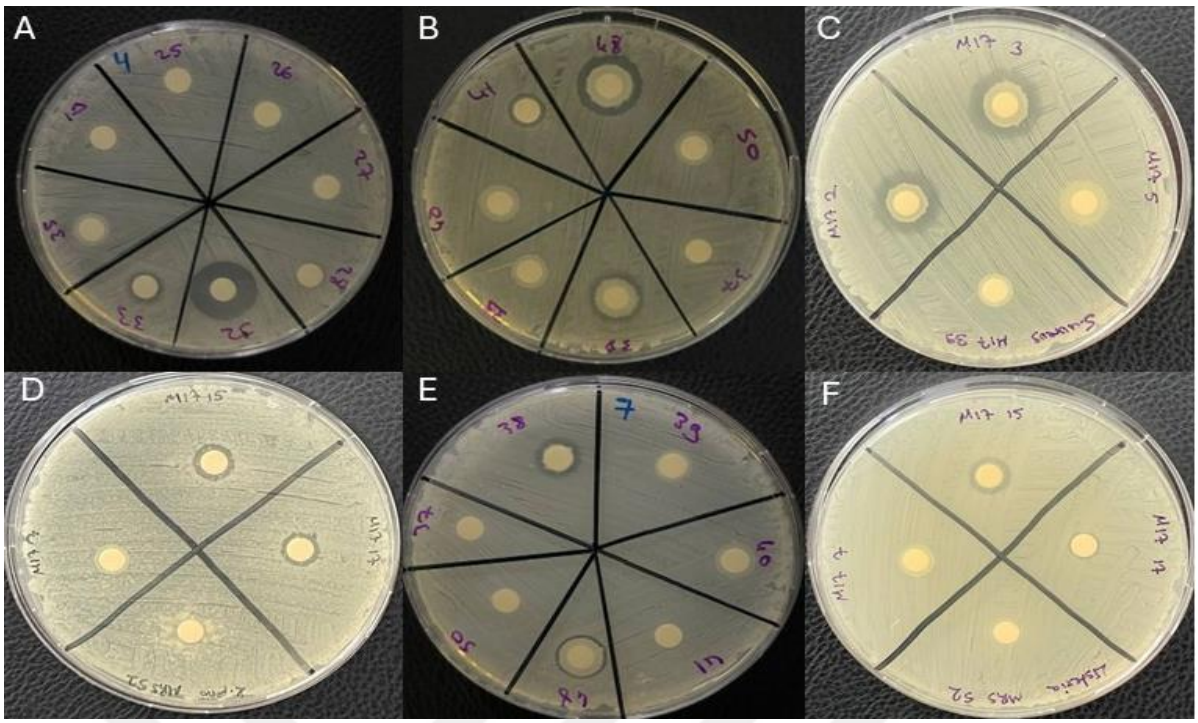
Bu çalışma, literatürle uyumlu olarak, probiyotiklerin bazı antibiyotiklere karşı dirençli olabileceğini, ancak bunların içsel ve zararsız olabileceğini vurgulamaktadır.

Antibakteriyel aktivite

LAB'lerin gıda güvenliği açısından antibakteriyel aktivite göstermesi önemli unsurlardan biridir. Yapılan tez çalışmasında, Gram negatif ve pozitif gıda patojenlerine karşı elde edilen LAB izolatları uygulandı ve elde edilen sonuçlar şekil 7 ve tablo 9'da gösterildi.

Tablo 9. LAB İzolatlarının Disk Difüzyon Test Sonuçları

İzolatlar	***E. coli O157H5***	***K. pneumoniae ATCC13883***	***L. monocytogenes RSKK474***	***S. aureus ATCC25923***	***B. cereus ATCC11778***	***S. pyogenes ATCC19615***
NK 4	-	-	7 mm	-	-	-
NK 5	-	-	15 mm	15 mm	14 mm	14 mm
NK 10	-	-	-	7 mm	-	-
NK 12	-	7 mm	13 mm	13 mm	12 mm	15 mm
NK 15	-	7 mm	-	-	-	-
NK 18	-	-	10 mm	-	12 mm	-
NK 19	-	-	-	7 mm	-	-
NK 16	-	-	-	5 mm	-	-
NK 17	-		20 mm	-	-	-
NK 25	7 mm	7 mm	-	-	-	-
NK 28	-	-	7 mm	-	-	-
NK 32	7 mm	-	-	-	-	-
NK 33	-	-	-	-	7 mm	-



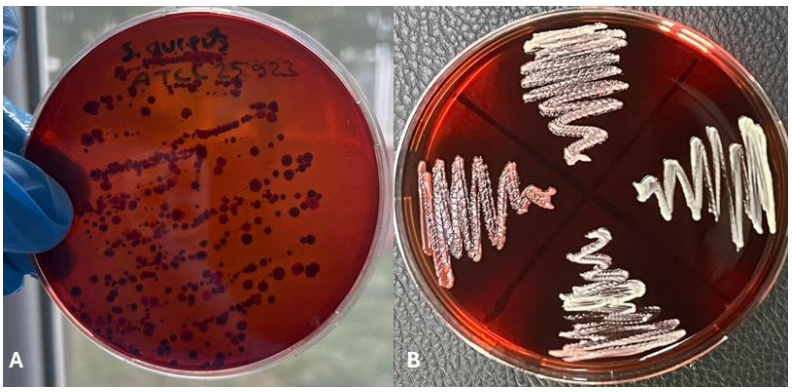
Şekil 7. LAB izolatlarının disk difüzyon test görüntüleri

Jena ve ark; yaptığı çalışmada Wistar cinsli sıçanların dışkısından izole edilen LAB izolatlarının hepsinde patojenlere karşı inhibitör aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. En büyük zon çapına (23,6 mm) ise *Lactobacillus acidophilus* NCDC15 suşunda tespit edilmiştir (Jena *et al.* 2013). Bargezar ve ark; yaptığı çalışmada süt örneklerinden izole edilen tüm LAB izolatlarının antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Bu izolatlar arasında en yüksek antibakteriyel etkiyi, 23,2 mm zon çapı ile *Lactobacillus acidophilus* B14 suşunun oluşturduğu belirtilmiştir. (Bargezar *et al.* 2021).

Biyofilm oluşumu

Bir grup bakteriler, çevresel faktörlere karşı direnç mekanizmaları geliştirmiştir. Bu direnç mekanizmalarından birisi de biyofilm oluşumudur. Gıda endüstrisinde ise biyofilm oluşumu, gıda bozulmasına veya patojen mikroorganizmaların gıdaya ya da gıda yüzeylerine tutunmasına neden olabileceği için, hijyen ve gıda güvenliği açısından istenmeyen bir durumdur. Önceki çalışmalarda bazı LAB türlerinin biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu bildirilmiş; bu özellikten sorumlu genler tanımlanmıştır. Oluşan biyofilm yapısı içeriğinde birçok bakteri türü ve besin içeriği bulunmaktadır. Bu yapı sayesinde bakteriler kendi aralarında rahatlıkla iletişim kurabilmektedir ve bu yüzden patojen mikroorganizmalar için elverişli bir ortam oluşturulmasına olanak sağlar (Cui *et al.* 2024).

Yapılan tez çalışmasında elde edilen LAB izolatlarının %34,48'nin biyofilm oluşturma kapasitesine sahip olduğu belirlendi. Pozitif olan izolatlar elemine edilirken negatif suşlar ile deneylere devam edildi. Biyofilm negatif izolatlara ait görsel şekil 8'de gösterildi.



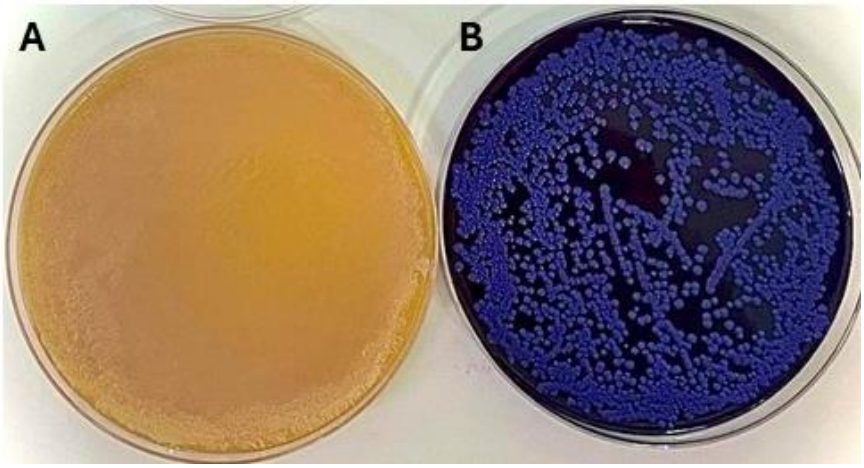
Şekil 8. A. Biyofilm pozitif olan *S.aureus* ATCC 25923 standart suşu; B. LAB izolatlarının biyofilm negatif suşları görüntüleri

Arık. (2018) yapmış olduğu çalışmada Bursa'da bulunan farklı gıda kaynaklarından LAB izole ederek, onların biyofilm oluşturma yeteneğini incelemiştir. Sonuçta elde edilen 40 LAB izolatından %52'si biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olmuştur (Arık. 2018).

Biyojen aminlerin üretimi

BA esas olarak aldehit ve ketonların aminasyonu, transaminasyonu ve amino asitlerin dekarboksilasyonu ile oluşmaktadır. Genellikle fermantasyon gibi biyokimyasal veya mikrobiyal işlemlere tabi tutulan protein ve amino asitlerden arındırılmış gıdalarda bulunur. Fermente ürünlerin içeriğinde bulunan Histamin ve Tiramin, genellikle toksik ve alerjik etkileri açısından tehdit oluşturduğu için daha fazla çalışma yapılmaktadır. BA üretimi *Enterococcus* ve *Lactobacillus* gibi bazı LAB suşları tarafından üretildiği bilinse de bazı suşlar BA içeriği bakımından negatif olarak bilinmektedir (Barbieri *et al.* 2019).

Çalışmada; amin dekarboksilaz aktivitesinin pozitif bir reaksiyonu, bromokrezol moru indikatörünün mor renge dönüşmesiyle belirlendi. Sonuç olarak; 15 izolattan üçü Tiramin, ikisi Histamin, ikisi Tirozin ürettiği belirlendi. Elde edilen izolatlarda, diğer BA üretimine rast gelinmedi. Modifiye edilmiş agarlarda BA varlığının veya yokluğunun meydana getirdiği renk değişimleri Şekil 9'da verildi. Sarı renkli agarın mor rengine dönüşmesi BA üretimim pozitif olduğunu göstermektedir.



Şekil 9. A. Biyojen amin üretimi negatif izolat; B. Biyojen amin üretimi pozitif izolat

BA üretimini belirlemek için yapılan agar bazlı testlerde renk değişimi (sarıdan mora) genellikle amin üretimine bağlı ortamın pH'sındaki değişiklik nedeniyle meydana gelir. Bakteriler amino asitleri (örn. histidin, tirozin, lizin vb.) dekarboksile ederek BA (örn. histamin, tiramin, kadaverin, putresin) üretir. Dekarboksilasyon reaksiyonları sonucunda CO_2 çıkışıyla birlikte bazik aminler birikerek ortamdaki pH artması ile sonuçlanır.

Colautti ve ark; Bover-Cid ve Holzapfel, 1999 tarafından açıklanan yöntem kullanarak, LAB suşlarının BA üretim yeteneğini incelemişler. Sonuçta *Lactobacillus casei* ve *Lactobacillus zeae* suşlarının hiçbiri BA üretmediğini, *Lactobacillus paracasei* suşları arasında, B195 suşu Tiramin, PSG10 suşu Agmatin ve B169 suşu hem Agmatin hem de Tiramin ürettiğini gözlemlediler. BA üretiminde rol oynayan genlerin multipleks PCR analizi sonucunda ise, tüm *Lactobacillus casei* ve *Lactobacillus zeae* suşlarının tüm hedef genler için negatif olduğunu, buna karşın *Lactobacillus paracasei'nin* altı suşunun *agdi* geni için pozitif olduğunu belirlediler. İki tekniğin sonuçları karşılaştırılıldığında suşlardan yalnızca birinde uyumlu sonuçlar elde etmişler. Bu genlerin moleküler tekniklerle tanımlanmasına rağmen, ilgili BA'lerin üretimini gözlemlemek mümkün olmamıştır. Bu tutarsızlık olası gen susturulmasına veya çok düşük ifadeye atfedilebilir ve bu da ürünlerin geleneksel plaka büyüme yöntemleri kullanılarak tespit edilmesini zorlaştırmaktadır (Colautti *et al.* 2024).

Bunkova ve ark'na göre, alkali reaksiyonlu kimyasalların oluşumu dekarboksilaz ortamındaki pH göstergesinde renk değişimlerine yol açarak yanlış pozitif reaksiyonlara neden olmuş olabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle, PCR analizi, karşılık gelen enzim üretimi için genlere sahip suşları tespit ettiği için, suşların biyojenik aminler üretme potansiyelini ortaya çıkarmak için daha iyi ve daha doğru bir yöntem olarak düşünülmektedir. Ancak tek bir genin varlığının, her zaman onun ifadesine dönüşmediğinin altı çizilmelidir. Gerçekten de çevresel

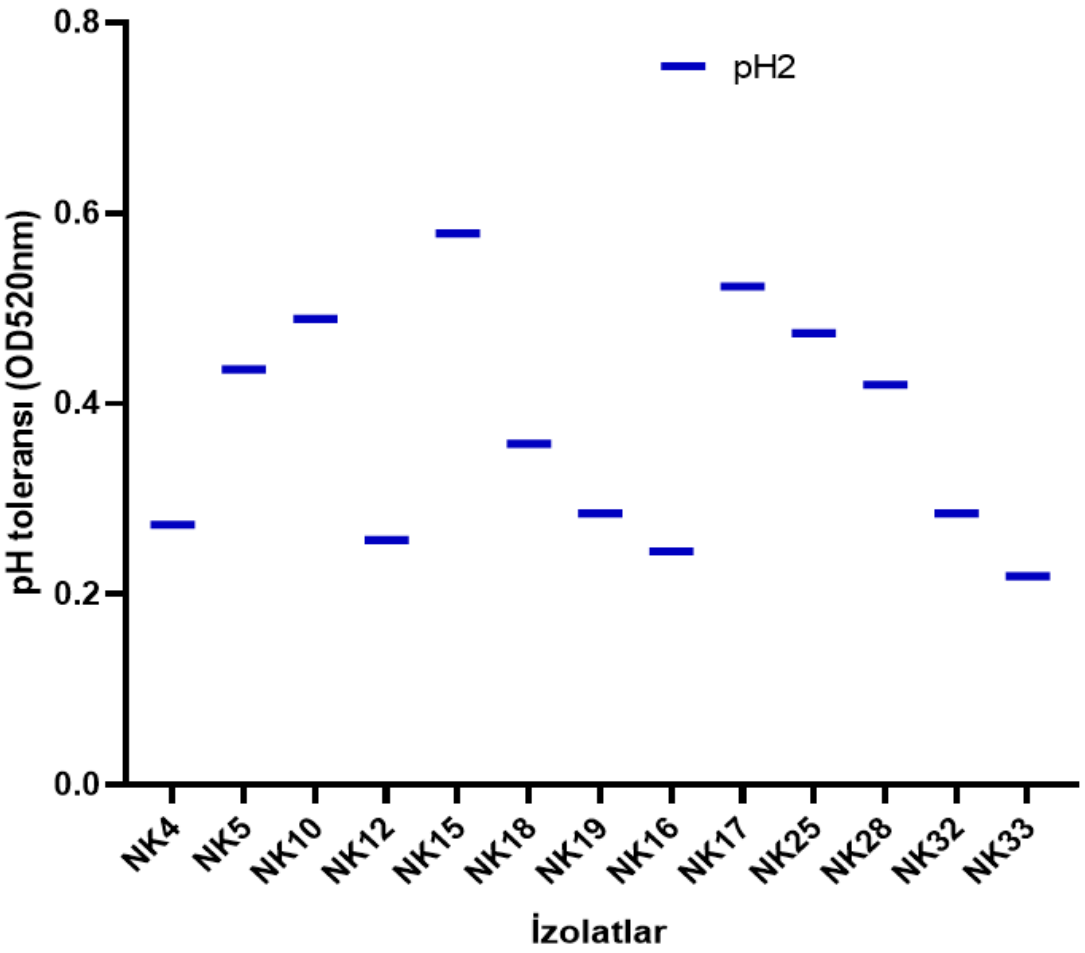
koşullar mikrobiyal metabolizmayı doğrudan etkiler. Bu nedenle, mikroorganizmaların hem genotiple hem de fenotiple incelenmesi son derece önemlidir (Bunkova *et al.* 2009).

Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi

Düşük pH direnci

Elde edilen LAB izolatlarının potansiyel bir probiyotik olarak kabul edilebilmesi için farklı aralıklarda bulunan düşük pH ortamlarına karşı direnç göstermesi gerekmektedir. Çünkü mide asidik bir ortama sahiptir.

Bu amaçla; uygun besi ortamında (pH1, pH2, pH3 değerlerinde MRS broth ve M17 broth) büyütülen bakterilerin gelişim oranları, OD600 nm'de spektrofotometrik olarak belirlendi. Yapılan ölçümler sonucunda NK4, NK5, NK10, NK12, NK15, NK18, NK19, NK25, NK16, NK17, NK25, NK28, NK32, NK33 ve NK35 kodlu 15 izolatın pH 1, 2 ve 3 gibi çok düşük pH 'da gelişim gösterdikleri gözlemlendi. Mide ortamına yakın olan düşük pH ortamında hayatta kalan 15 izolatın potansiyel probiyotik bakteri adayı olabileceği düşüncesiyle diğer deneysel süreçlere bu 15 izolat üzerinden devam edildi. Belirtilen 15 izolatın; pH 2 değerinde optimum gelişimlerini gösteren OD600 nm ölçüm sonuçları Şekil 10' da gösterilmiştir. Asidik pH ortamın da en iyi pH 2 toleransını gösteren suş NK12 olduğu belirlenerek, diğer izolatlarında düşük pH'da hayatta kalabildiği belirlendi.



Şekil 10. LAB İzolatlarının pH 2'de gelişim değerleri

Byakika, Bargezar ve arkadaşlarına göre, probiyotikler belirli faydalar sağlayan canlı mikroorganizmalardır ve pH seviyesinin 3.0'a kadar düştüğü mide ortamında 2-4 saatlik bir süre boyunca hayatta kalarak, gelişim göstermelidirler. Aksi halde, midedeki düşük pH ortamına karşı dirençli olmayan herhangi LAB, probiyotik özelliklerini gösteremez (Bargezar *et al.* 2013; Byakika *et al.* 2020). Yapılan çalışma Nath, Odu ve arkadaşlarının yapmış olduğu pH direnci deneyinin sonuçlarıyla benzerlik gösterdiği belirlendi (Nath *et al.* 2020; Odu *et al.* 2021).

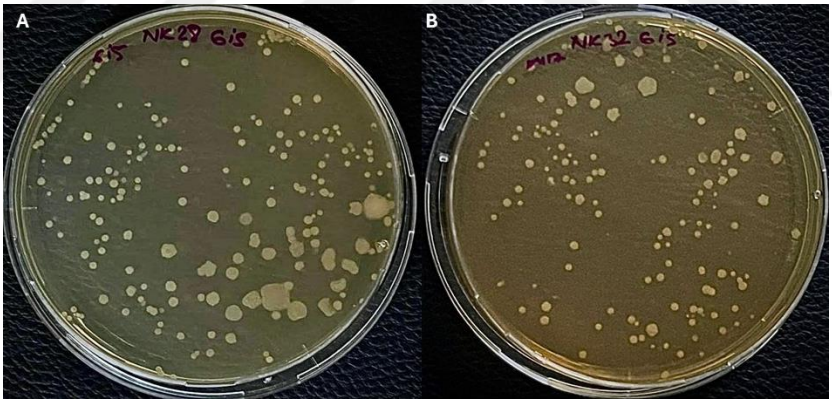
Gastrointestinal sistem koşullarına karşı direnç

Vücuda probiyotikler alındığı zaman ilk olarak ağız boşluğunda bulunan tükürük içindeki lizozimin yüksek konsantrasyonuna maruz kalır. Bu ortamdan başarıyla geçtikten sonra, mikroorganizmanın düşük pH'lı mide, safra tuzları ve sindirim enzimleri içeren ince bağırsaktan oluşan GİS koşullarını, canlılığını ve popülasyon düzeyini kaybetmeden uzun süre boyunca geçebilmesi gerekmektedir. Yapılan çalışmada LAB izolatları simüle edilmiş mide ve bağırsak koşullarına maruz bırakıldıktan sonra, canlı kalan bakteri sayısı hesaplanmıştır (log

CFU/ml). Sonuçlar Tablo 10' da verilmiştir. GIS deneyi petri görüntüleri Şekil 11'de gösterilmiştir.

Tablo 10. LAB İzolatlarının GIS Deney Sonuçları

İzolatlar	Hayatta kalan bakteri sayısı
NK4	6,76 ± 1,12
NK5	9,41 ± 0,73
NK10	6,71 ± 1,14
NK12	9,38 ± 0,63
NK15	6,23 ± 0,92
NK18	6,2 ± 1,12
NK19	9,32 ± 1,11
NK16	9,15 ± 0,73
NK 17	9,11 ± 0,56
NK25	9,33± 0,58
NK28	9,13 ± 1,1
NK32	9,28 ± 0,82
NK33	9,27± 0,94



Şekil 11. A. NK28 suşuna ait GİS petri görüntüsü; B. NK32 suşuna ait GİS petri görüntüsü

Yapılan çalışmada LAB izolatlarının GİS koşullarına karşı dirençli olduğu belirlendi. İzolatlar arasında en yüksek direnç gösteren LAB olarak NK 12 izolatı (9,38) belirlendi. Bu tez çalışmasının sonuçları önceki çalışmalarla uyumlu olduğu sonucuna varıldı.

Ashraf ve ark; yaptığı çalışmada *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus* G5435, *Lactobacillus acidophilus* 388, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 11842, *Streptococcus thermophilus* 1342, *Bifidobacterium lactis* BB12'nin mide ve bağırsağın değişen pH ortamlarına karşı dirençli olduğu bildirilmiştir (Ashraf ve Smith. 2016).

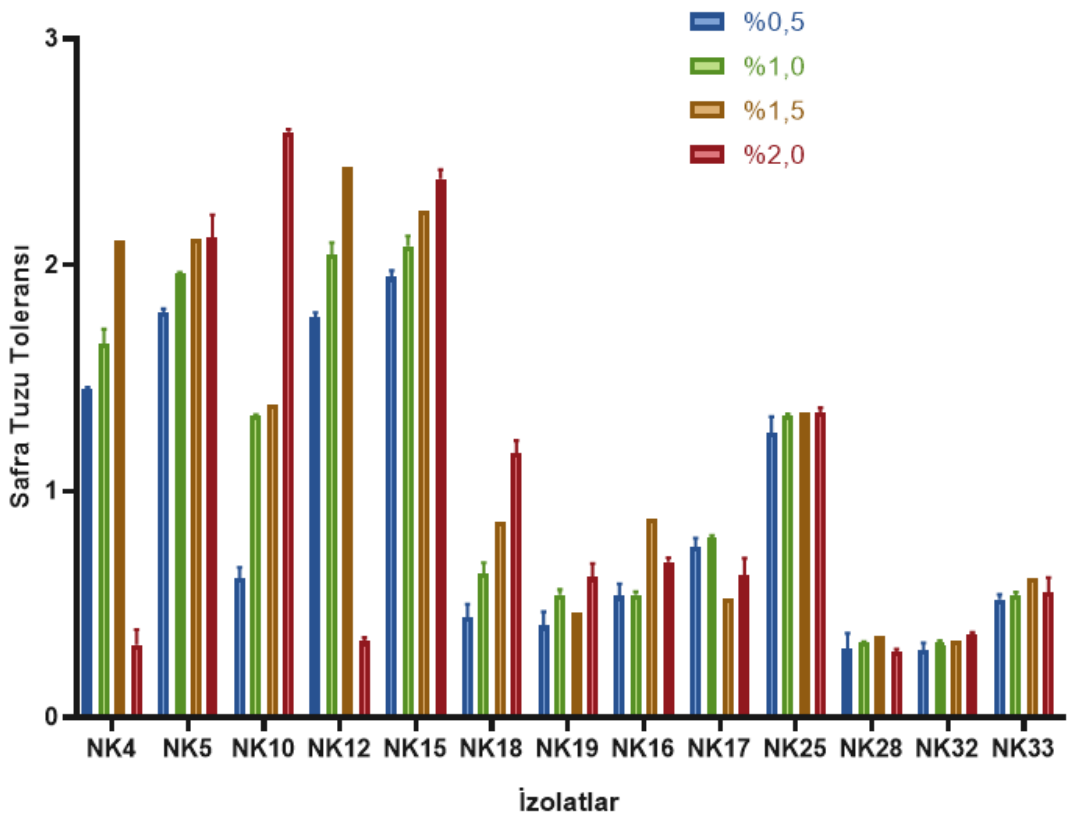
Feng ve ark; yaptığı çalışmada domuz bağırsağından *Enterococcus faecium* ve *Lactiplantibacillus plantarum* ait farklı suşlar izole edilmiş ve onların probiyotik

potansiyelini değerlendirmek için GIS deneyini yapmışlar ve sonuç olarak WEI-9 ve WEI-10 suşlarının hayatta kalma oranın %97'nin üzerinde olduğunu tespit etmişlerdir (Feng *et al.* 2017).

Yapılan bir diğer çalışmada Bargezar ve ark; *Lactobacillus casei* B22, *Lactobacillus brevis* B3 ve *Lactobacillus plantarum* B20 suşları hariç, diğer tüm suşlar GİS'e dirençli olarak kabul edilmiştir. Standart suşla karşılaştırıldığında izolatlar arasında en yüksek direnç gösteren suş *Lactobacillus acidophilus* (B14) olarak belirlenmiştir (Bargezar *et al.* 2021).

Safra tuzuna karşı dirençlerinin belirlenmesi

LAB en önemli probiyotik özelliklerinden biri de vücutta bulunan yüksek safra konsantrasyonlarına dayanıklı olmasıdır. Bunun sebebi ise vücutta bulunan yüksek miktardaki safra tuzunun hücre zarının lipitlerine ve yağ asitlerine zarar vererek, organizmaların hayatta kalma şansını azaltmasıdır. Yapılan çalışmanın sonucunda tüm bakteri izolatlarının safra tuzunun %1,0, %1,5 ve %2,0 konsantrasyonlarına karşı dirençli olduğu belirlendi. LAB izolatları için en iyi safra toleransı %1,5 safra tuzu konsantrasyonunda görüldü ve sonuçlar Şekil.10'da gösterildi.



Şekil 12. LAB izolatlarının safra tuzuna karşı direnç sonuçları

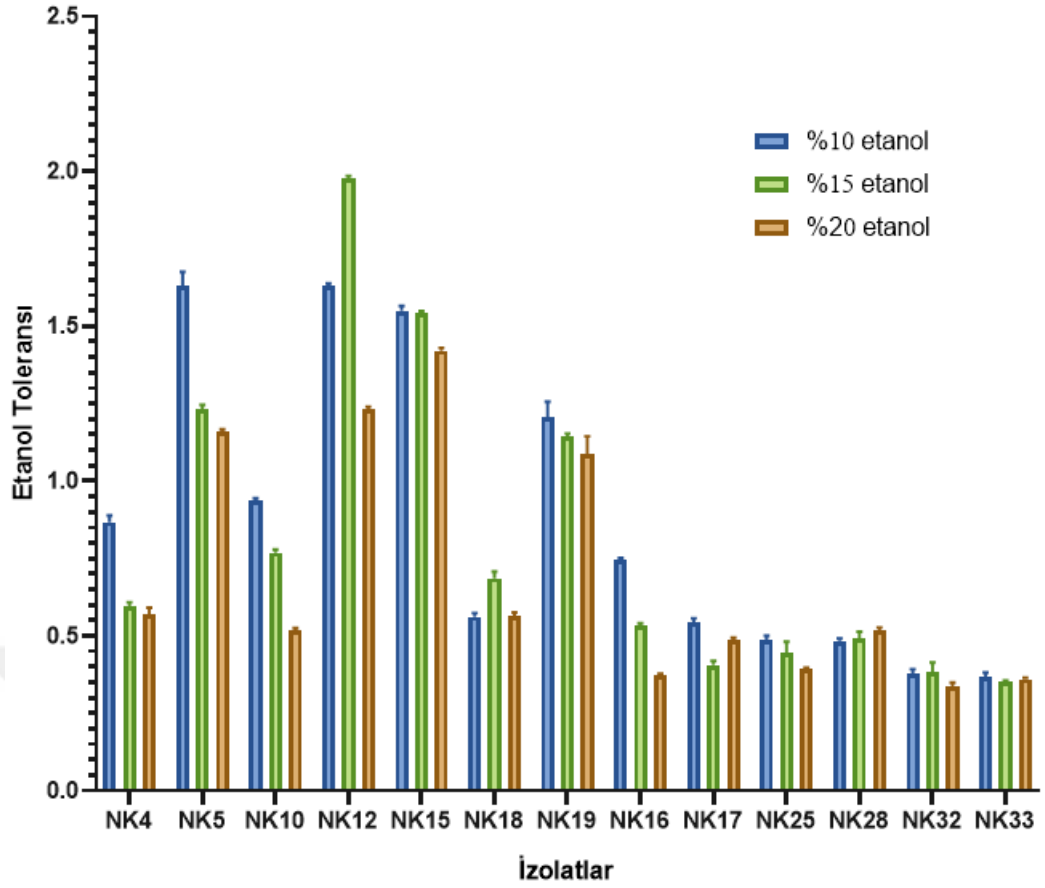
Yapılan çalışmada LAB izolatlarının yüksek safra miktarına dirençli olduğu belirlendi. Özellikle de NK4, NK5, NK10, NK12, NK15 ve NK25 kodlu izolatlarında %1,5 safra konsantrasyonunda büyüme oranın arttığı gözlemlendi. Elde edilen sonuçların Odu ve ark;

yaptığı çalışmanın sonuçlarına benzerlik gösterdi. Odu ve ark; Ogi ve Palmiye şarabından izole ettikleri LAB suşlarının %1,0; %1,5 ve %2,0 safra konsantrasyonlarına dayanıklı olduğunu, özellikle de %1,5 safra konsantrasyonunda büyüme oranın arttığını gözlemlemiştir (Odu *et al.* 2021).

Etanol toleransı

Şarap fermantasyonun başlangıcında, alkol seviyeleri %5-6 civarındadır ve bu aşamada içeriğindeki LAB miktarı fazladır. Şarap içeriğindeki alkol oranı yükseldikçe, birçok LAB türü için yaşam koşulları zorlaşmaktadır. Genellikle %14 ve üzeri oranındaki alkol konsantrasyonu LAB türlerinin aktivitesini durdurarak, hayatta kalmalarını zorlaştırır. Ancak, *Oenococcus oeni* ve bazı *Lactobacillus* ve *Pediococcus* türleri, şarapta %15'in üzerinde ve hatta bazı durumlarda %17-19 gibi yüksek etanol konsantrasyonlarında bile büyüyebilme ve MLF gerçekleştirebilme yeteneği sahip olabildikleri bilinmektedir. Yüksek etanol toleransı, bu bakterilerin şarap yapımında başarılı MLF için tercih edilmesinin önemli nedenlerinden birisidir (Succi *et al.* 2025).

Şekil 13'te, bakteri izolatlarının etanol toleransını gösterilmektedir. Sonuçlar, incelenen tüm izolatların %10, %15 ve %20 etanol konsantrasyonlarında gelişebildiğini sonucuna varıldı. Özellikle %15 etanol konsantrasyonu sahip ortamda optimum tolerans aralığına ulaşıldığı gözlemlendi.



Şekil 13. LAB izolatlarının etanol toleransı değerleri

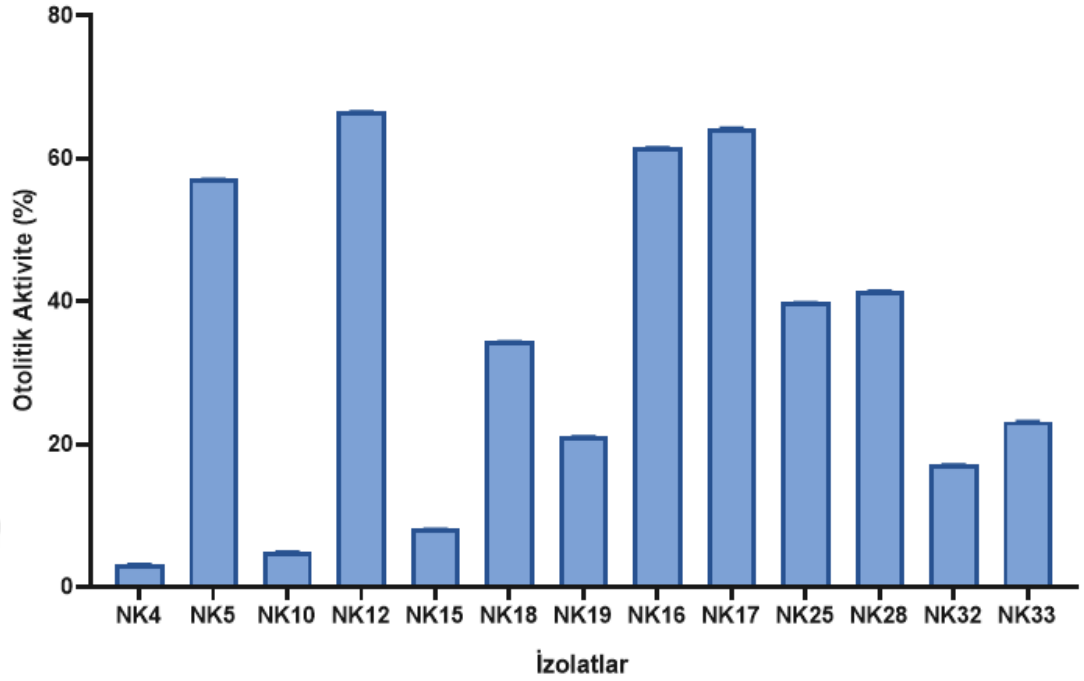
Odu ve ark; Ogi ve Palmiye şaraplarından izole ettikleri LAB etanol toleransını değerlendirdiklerinde %15 etanol konsantrasyonuna izolatların daha toleranslı olduğu sonucuna varmışlardır (Odu *et al.* 2021).

Otolitik aktivite

Çalışmada izole edilen LAB suşlarının otolitik aktiviteye sahip olduğu gözlemlenerek, probiyotik etkiler açısından önemli bir avantaj sunmaktadır. Otoliz süreci, hücre içi lipaz ve proteaz gibi enzimlerin salınımına yol açarak, özellikle fermente ürünlerin duyusal (tat ve aroma) ve dokusal özelliklerinin iyileştirilmesine katkı sağlamaktadır. Bu enzimlerin ortama salınması, aynı zamanda sindirilebilirlik ve biyoyararlanım açısından da pozitif etkiler yaratabilmektedir. Bazı LAB'lerin bakteri hücre duvarından bir miktar hidrolaz salgılayabildiği ve peptidoglikanı parçalayabildiği bilinmektedir; bu süreç karbon kaynağı, sıcaklık, ozmotik konsantrasyon ve pH gibi çeşitli faktörlerden etkilenebilir. N-asetilmuramidaz, *Lactobacillus bulgaricus*'un otolizinde kritik bir işleve sahiptir ve hücre duvarı yıkımının başlıca nedenlerinden biri olarak bilinir.

Sonuç olarak, otolitik aktivite özellikleri, izole edilen LAB suşlarının probiyotik potansiyelini destekleyen önemli parametreler olarak değerlendirilmiş olup, bu özelliklerin bir

arada bulunması söz konusu suşların fonksiyonel gıda formülasyonlarında kullanılabilirliğini artırmaktadır. LAB izolatlarının otolitik aktiviteleri Şekil 14'te gösterildi.



Şekil 14. LAB izolatlarının otolitik aktivitesi sonuçları

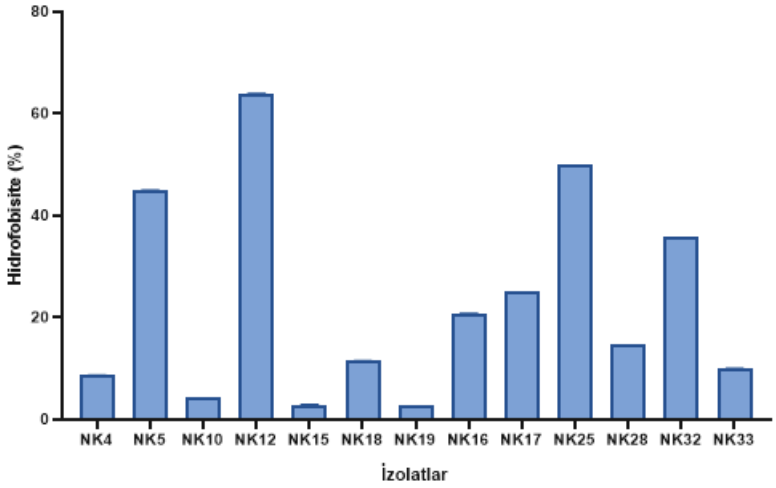
Ayad ve arkadaşları (2004) tarafından önerilen gruplandırmaya göre, çalışmada izolatların %54,55'i iyi otolitik aktivite (%25 ile %65 arasında aktivite), %27,3'ü nispeten iyi otolitik aktivite (%15 ile %24 arasında aktivite) ve %18,2'si düşük otolitik aktivite (%14'ün altında) gösterdi. En yüksek otolitik aktivite NK5 (%66,59), en düşük otolitik aktivite ise NK4 (%3,2) izolatına aittir.

Ebadi Nezhad ve ark; Motal peynirinden izole ettikleri LAB suşlarının otolitik özelliklerini araştırmışdır. Yapılan çalışma sonucunda, 16 LAB izolatının otolitik aktivitesinin %6,28 ile %38,28 arasında değiştiği belirlenmiştir. İzolatların %25'inin yüksek düzeyde, %50'sinin ise orta düzeyde otolitik aktiviteye sahip olduğu, otolitik aktivitesi %14'ün altında kalan izolatların ise zayıf otolitik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. (Nezhat *et al.* 2020).

Hücre yüzeyi hidrofobisitesi

Probiyotik bakteri suşlarının konak hücre yüzeylerine adezyon kapasiteleri, büyük ölçüde hücre yüzeyi hidrofobisitesi ile ilişkilidir. Hidrofobisite, bakteriyel hücrelerin çevresel yüzeylerle etkileşimini etkileyen önemli bir özellik olup, aynı zamanda kolonizasyon potansiyelinin de bir göstergesidir (Zhang *et al.* 2022). Çalışmada, LAB suşlarının hücre yüzeyi hidrofobisitesi, organik bir çözücü olan n-heksadekan kullanılarak değerlendirildi. Bu amaçla, bakteri süspansiyonlarının çözücülerle karıştırılmasından önce ve sonra sulu fazdaki absorbans

değişimi (OD600nm) ölçülerek yüzey etkileşimi nicel olarak analiz edildi. Sonuçlar şekil 15'te gösterilmiştir.



Şekil 15. LAB izolatlarının hidrofobisite testi sonuçları

Elde edilen bulgular doğrultusunda, çalışmada test edilen LAB suşlarının önemli düzeyde değişkenlik gösteren hidrofobisite profillerine sahip olduğu belirlendi. En iyi hidrofobik aktivite NK12 izolatında (%64), en düşük aktivite ise NK19 (%2,64) izolatında tespit edildi. Bu durum, daha önce yapılan çalışmalarla da uyumludur. Örneğin, Bargezar ve ark. *Lactobacillus acidophilus* B14 suşunda %65,9 ile en yüksek, *Lactobacillus casei* B22 suşunda ise %25,6 ile en düşük hidrofobisite değeri tespit edilmiştir. Bu veriler, aynı tür içerisinde bile suşlar arası yüzey özelliklerinin ciddi farklılıklar gösterebileceğine işaret etmektedir (Bargezar *et al.* 2021).

Benzer şekilde, Guan ve ark; yaptığı çalışmada hücre yüzeyi hidrofobisitesi %14,8 ile %57,3 arasında değişmiş, bu farklılıkların bakteri hücre yüzeyindeki kimyasal ve yapısal heterojenlikten kaynaklandığı belirtilmiştir (Guan *et al.* 2020).

Çalışmanın bulguları da bu görüşü desteklemekte olup, LAB suşlarının konak yüzeylerine adezyon kapasitesinin yalnızca tür düzeyinde değil, suş düzeyinde değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir. Hidrofobisite düzeyi yüksek olan suşlar, GİS'te daha etkili kolonizasyon gösterebilmekte ve bu sayede probiyotik etkilerini daha kararlı bir şekilde sürdürebilmektedir.

Laktik Asit Bakterilerinin Teknolojik Özelliklerin Değerlendirilmesi

Laktik asit bakterilerinin asitleştirme yeteneğinin belirlenmesi

Nieto-Arribas *et al.* (2009) sınıflandırmasına göre izolatlar, 24 saatlik inkübasyondan sonra asitleştirme yeteneğine göre üç gruba ayrılır:

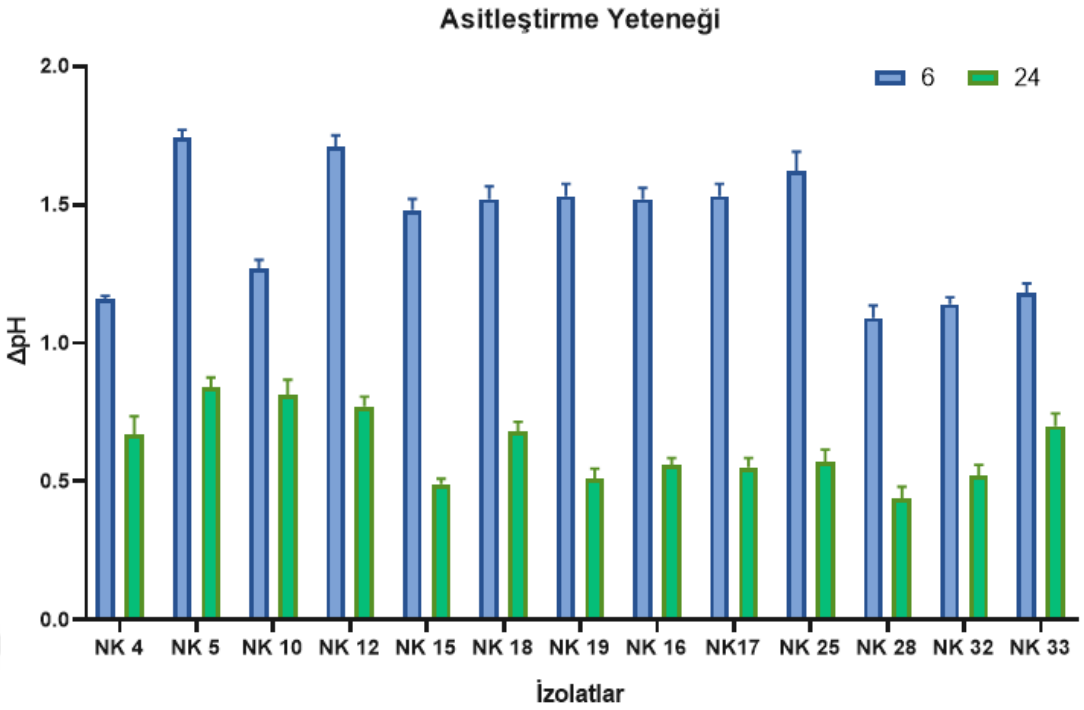
1) pH' ı 2 birimden fazla düşüren yüksek asit kapasitesine sahip olanlar,
2) pH' ı 1,5-2 birim aralığında düşürme yeteneğine sahip orta asit kapasitesine sahip olanlar,
3) pH' ı 1,5 birimden daha az düşürme yeteneğine sahip düşük asit kapasitesine sahip olanlar (Nieto-Arribas *et al.* 2009).

Çeşitli fermente gıda ürünlerinde bulunan LAB'ların önemli özelliklerinden biri de asidik koşullar oluşturma potansiyelleridir. Asit üretimi, sonrasında pH'ın düşmesi, üründe özel bir lezzet oluşturur, patojenik bakterileri inhibe edebilir, ürünün güvenliği ve raf ömrü önemli ölçüde artırmaktadır. Fermantasyon sürecinde mikroorganizmaların ortam pH'sını yavaş bir şekilde düşmesi istenilmeyen bir durumdur. Çünkü bu durum gıda ürünün mikrobiyolojik ve dokusunda değişikliklere neden olmaktadır (Ma *et al.*2012; Tilocca *et al.* 2020).

Çalışmada elde edilen LAB izolatlarının asitleştirme yetenekleri Şekil 16'da gösterildi.

Yapılan çalışma sonucunda, NK5, NK12, NK16, NK17, NK18, NK19 ve NK25 kodlu izolatların bulundukları ortamın pH'ını 1,5 ila 2 birim arasında düşürdükleri ve bu nedenle orta düzey asit üretme kapasitesine sahip oldukları belirlenmiştir. Diğer izolatların ise pH'ı 1,5 birimden daha az düşürdüğü ve bu nedenle düşük asit üretme kapasitesine sahip LAB izolatları olarak değerlendirildiği tespit edildi.

Ebadi Nezhad ve ark; Lactobacillus spp. suşlarının 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda bulundukları ortamın pH'ını 0,67 ile 2,06 birim arasında düşürdüğünü bildirmiştir. Bu durum, söz konusu suşların çevreyi asitleştirme potansiyelinin nispeten düşük düzeyde olduğunu göstermektedir (Nezhad *et al.* 2020). Bargezar ve ark; yaptığı çalışmada bu sınıflandırmaya göre değerlendirme yapmış ve sonuçta, ortamdakı pH'ı 1,5 ila 2 birim arasında düşürerek *L. acidophilus* B17 hariç tüm Lactobacillus suşların orta asit kapasitesine sahip olduğunu belirlemişler (Bargezar *et al.* 2021).

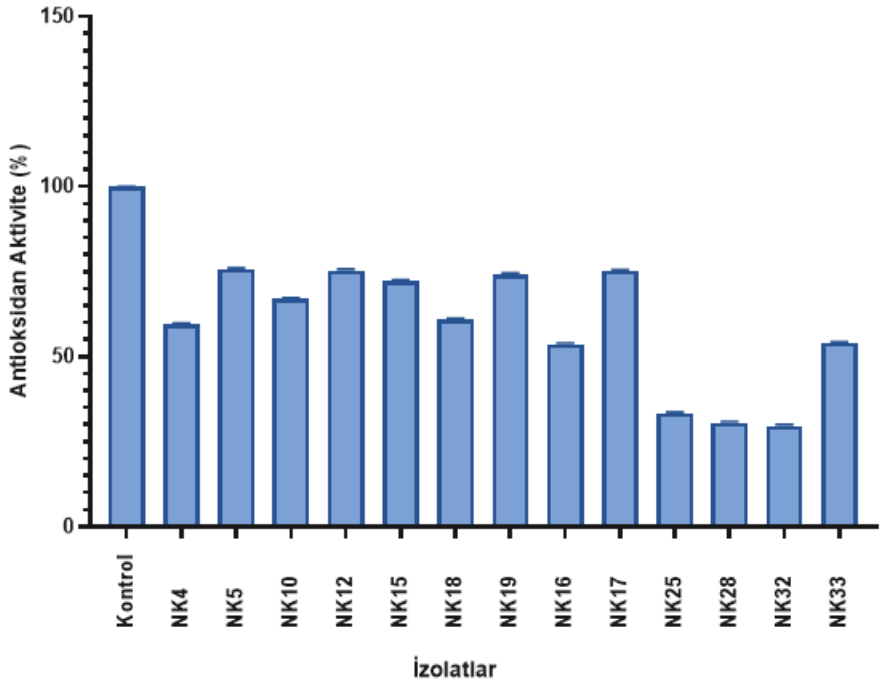


Şekil 16. LAB izolatların asitleştirme yeteneği sonuçları

Laktik asit bakterilerinin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi

Oksidatif stresin neden olduğu serbest radikaller, bireyin yaşlanmasına ve yaşlanmaya bağlı hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Ayrıca artan radikaller vücudun inflamatuar yanıtlarında artamaya sebep olmaktadır. Yapılan çalışmalarda mekanizma tam anlamıyla çözülmüş olmasa da sıkça tercih edilen probiyotik LAB'ler sayesinde reaktif oksijen serbest radikallerini temizleyebileceği anlaşılmıştır. Aktivite gerçekleşirken indirgeyici aktivite ve demir iyonlarıyla şelasyon kapasitesine bağlanmıştır (Hu *et al.* 2023).

LAB antioksidan aktiviteye sahiptir ve bu çalışmada, güçlü antioksidan kapasiteye sahip suşlar 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) deneyi yapılarak belirlendi. En yüksek antioksidan kapasiteye sahip suş NK5 (%75,7) oldu ve sonuçlar Şekil 17'de gösterildi.



Şekil 17. LAB izolatlarının antioksidan aktivitesi sonuçları

Hu ve ark; fermente gıdalardan ("Jiangshui" ve turşular) elde edilen 15 LAB suşu antioksidan özellikleri açısından değerlendirmiştir. Yapılan çalışmanın sonucunda en yüksek antioksidan kapasiteye sahip suşun J2-9 (%83,97) olarak belirlenmiştir (Hu *et al.* 2023). Aziz ve ark; DPPH radikal temizleme deneyi ile Lactiplantibacillus plantarum suşlarının antioksidan kapasitelerini değerlendirmiş ve çalışmalarında Lactiplantibacillus plantarum 12–3 suşunun %58,1 oranıyla en yüksek antioksidan aktiviteyi gösterdiğini bildirmişlerdir. (Aziz *et al.* 2023). Çalışmanın sonuçları literatür ile uyumludur.

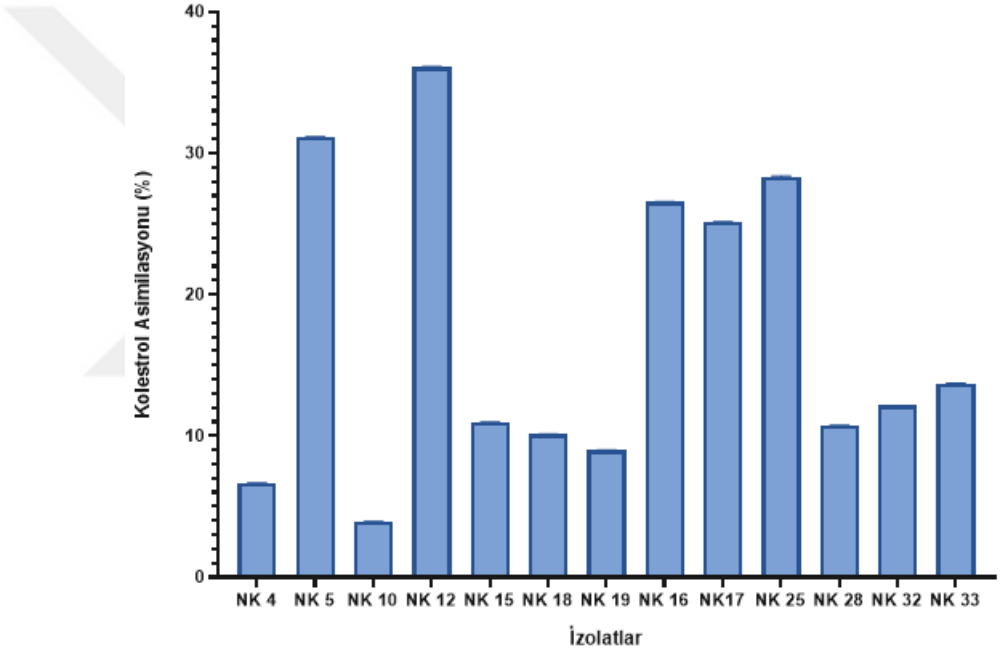
Kolestrol asimilasyonu

Bir LAB'ın potansiyel probiyotik olarak kabul edilebilmesi için vücutta bulunan kolesterol oranını düşürmesi gerekmektedir. Yapılan çalışmalarda izole edilen LAB'lerin kolesterol asimilasyon yeteneğine sahip olduğu bildirildi. Yüksek serum kolesterol seviyesi insanlarda genellikle kardiyovasküler hastalıklar, obezite, koroner kalp hastalıkları ve diğer metabolik hastalıklara neden olmaktadır. Bu yüksek kolesterol seviyesini düşürebilmek için çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Bunlar; diyet, düzenli fiziksel egzersiz ve terapötik yaklaşımlar ile yüksek kolesterol seviyesi düşürülebilir. Fakat kullanılan ilaçlar bireylerde kas ağrısı ve karaciğer toksisitesi gibi sorunlara neden olmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda probiyotik LAB' lerin kolesterol asimilasyon yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (Bhat ve Bajaj. 2020).

Bu çalışmada izolatların 24 saatlik inkübasyondan sonra *in vitro* asimile edilen kolesterol miktarı %1,42-%36,09 arasında değiştiği gözlemlendi (Şekil 18). Beş suş, değişken

bir oranda asimilasyon özelliği (>%20) gösterdi ve diğer suşların kolesterol asimile etme yeteneği daha düşük olduğu belirlendi. (<%10). Bu bulgular, özellikle hiperkolesterolemiye karşı biyoterapötik yaklaşımlar geliştirilmesinde probiyotik LAB kullanımının umut verici olduğunu göstermektedir. Önceki çalışmalarda da belirtildiği üzere, probiyotik etkinin ortaya çıkabilmesi için bakterilerin yüksek canlılık oranına sahip olması gerekmektedir ve bu eşik genellikle 10^6 CFU/mL olarak kabul edilmektedir (Priya *et al.* 2021).

Bununla birlikte, çalışmada kullanılan LAB izolatlarının Azerbaycan'da geleneksel olarak fermente edilen şaraptan izole edilmesi, bu tür içeceklerin sadece kültürel önemiyle değil, aynı zamanda sağlık açısından taşıdığı değeri de ortaya koymaktadır. Ancak literatürde bu suşların kolesterol düşürücü potansiyeline dair verilerin oldukça sınırlı olması, çalışmamızın özgünlüğünü artırmakta ve gelecekte yapılacak klinik araştırmalar için temel oluşturmaktadır.



Şekil 18. LAB izolatlarının kolesterol asimilasyonu sonuçları

Fossi ve ark; probiyotik özelliği gösteren LAB suşlarının kolestrol asimilasyonu yeteneğini araştırmışlar. Yapılan deneyin sonucunda LAB suşlarının *in vitro* asimile edilen kolesterol miktarı %28- %89 arasında değişlik göstermiştir (Fossi *et al.* 2022).

Elde edilen veriler doğrultusunda, geleneksel fermente içecek kaynaklı LAB suşlarının hem probiyotik potansiyellerinin hem de kolesterol düşürücü kapasitelerinin daha geniş kapsamlı *in vivo* çalışmalarla da desteklenmesi gerektiği düşünülmektedir. Ayrıca, bu tür suşların fonksiyonel içecek formülasyonlarına entegrasyonu ile hem halk sağlığına katkı sunulabilir hem de yerel biyokültürel kaynakların değerlendirilmesi mümkün hale gelebilir.

LAB izolatların proteolitik, lipolitik ve jelatinaz aktivitesi

Üzüm şırasında protein yapıdaki moleküller bulunur ve şarap üretimi sırasında şarabın renginin bulanıklaşmasına neden olmaktadır. Bu proteinlerin proteolitik enzimlerle parçalanması sonucunda serbest amino asitler oluşturur ve bununla da şarabın protein stabilitesinde artış gözlemlenir. Sonuçta şaraplarda, özellikle de beyaz şarapların rengin bulanıklaşmasına ve aroma değişikliğine sebep olmaktadır. Lipolitik aktivite ise, acı veya sabunumsu tatlar oluşturduğundan, şarap üretiminde lipolitik enzim aktivitesi genellikle istenmez ve önlenmeye çalışılır. Çalışmada, LAB izolatlarından NK12, NK15 ve NK19 kodlu izolatlar hariç tüm izolatlarda proteolitik aktivite gözlemlenirken, lipolitik aktiviteye hiçbir izolatta rastlanmamıştır. Bu sonuç, özellikle proteolitik kapasitenin izolatların potansiyel teknolojik uygulamaları açısından önemli olduğunu ve bazı suşların fermentatif süreçlerde protein yıkımı yoluyla işlevsel katkılar sağlayabileceğini göstermektedir.

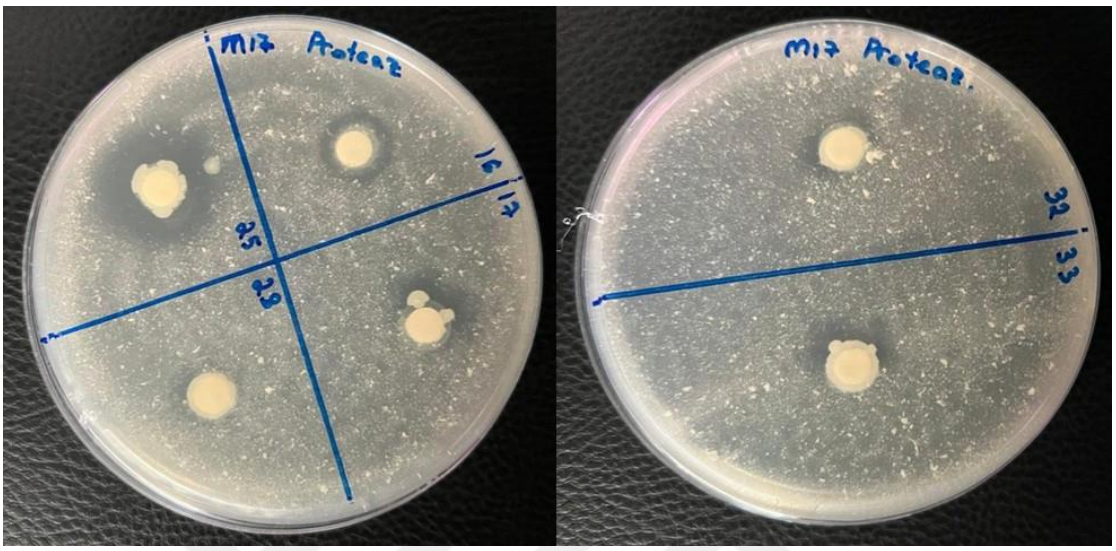
Jelatinaz aktivitesi, LAB'da hem gıda kalitesi hem de insan sağlığı açısından istenmeyen özellik olarak kabul edilmiştir. Çünkü bu aktivitenin virülans faktörü bulunmaktadır. Jelatinaz, proteinleri (özellikle kolajen ve jelatin gibi yapısal proteinleri) parçalayan bir enzim olduğu için, özellikle hayvansal kaynaklı gıdalarda (örneğin süt ürünleri, et ürünleri) bozulmaya neden olabilmektedir. LAB'lerin probiyotik değerlendirmesi ve endüstriyel kullanımda jeletinaz aktivitesi istenmeyen özellikler arasında yer almaktadır (Rodrigues *et al.* 2021). Bu çalışmada da ideale uygun olarak, jelatinaz aktivitesine sahip izolat sahip izolat tespit edildi.

Bargezar ve ark; yaptığı çalışmada elde edilen sonuçlar, seçilen LAB suşlarının düşük lipolitik fakat değişken düzeylerde proteolitik aktivite göstermesi nedeniyle, süt endüstrisinde hem ürün kalitesi hem de hedeflenen lezzet profili açısından seçici bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir (Bargezar *et al.* 2021).

Diğer enzim aktiviteleri

LAB, proteazlar, peptidazlar, polisakkarit parçalayıcı enzimler, lipazlar, amilazlar ve esterazlar gibi çok çeşitli enzimler üretebilir (Bunea *et al.* 2022). Farklı malolaktik bakteri suşları, şarabın aroma ve lezzet özelliklerinin yoğunluğunu artırabilir veya azaltabilir. Bu çalışmada izole edilen LAB suşlarının, ticari *Oenococcus. oeni* kontrol suşuyla karşılaştırıldığında benzer düzeyde ortalama proteaz aktivitesi gösterdiği belirlendi. Bu durum, izole edilen suşların şarap fermantasyonu sırasında protein yapılarının parçalanması ve aroma öncüllerinin serbest bırakılması açısından ticari suşlarla benzer potansiyele sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Buna karşılık, proteolitik aktivitesine altı izolatda rastlanırken, lipaz

aktivitesine sadece bir izolatta gözlemlendi. β-glukosidaz ve esteraz aktivitesi hiçbir izolatta tespit edilemedi. Bu veriler, LAB suşlarının enzimatik profillerinde bireysel varyasyonlar bulunduğunu, dolayısıyla her bir suşun potansiyel fonksiyonel özelliklerinin ayrı ayrı değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir. Proteaz aktivitesine ait sonuçlar Şekil 19'da gösterildi.



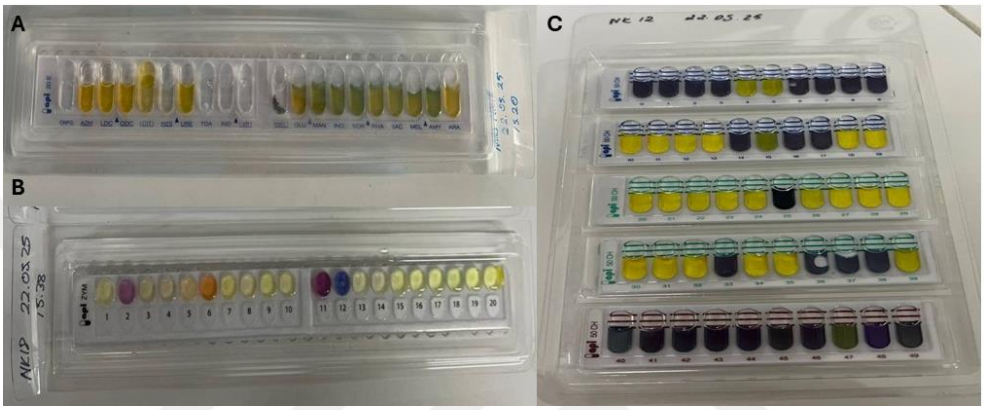
Şekil 19. LAB izolatlarının proteolitik aktivitesi görüntüleri

Davis ve ark, yaptıkları çalışmada hücre dışı proteaz aktivitesi gösteren şarap kaynaklı LAB suşlarına rastlamamış; lipaz üretiminin yalnızca birkaç *Oenococcus oeni* suşu ve bir *Lactobacillus* sp. suşunda gözlemlendiğini, buna karşılık LAB suşlarının büyük bir kısmının esteraz aktivitesi gösterdiğini raporlamışlardır. Bu çalışma ile elde edilen bulgular karşılaştırıldığında, izole edilen *Lactiplantibacillus plantarum* suşlarının esteraz aktivitesine ek olarak lipaz ve β-glukosidaz gibi lipolitik ve glikolitik enzimler bakımından da zengin bir profil sunduğu söylenebilir (Davis *et al.* 1988).

Özellikle β-glukosidaz enzimi, şarap aromasında belirleyici rol oynayan aroma öncüllerinin (örneğin monoterpen glikozitleri) serbestleştirilmesinde kritik öneme sahiptir. Glikozidik bağların hidrolizi ile uçucu aroma bileşenleri açığa çıkar; bu da şaraplarda çeşitliliğe özgü aromatik profillerin oluşumuna katkı sağlar. Benzer şekilde, lipaz ve esteraz enzimleri, kısa ve uzun zincirli yağ asidi esterlerini hidrolize ederek tat ve koku üzerinde etkili olan ikincil metabolitlerin oluşumuna neden olurlar. Lerm ve ark; tarafından yapılan genetik analizler, *Lactiplantibacillus plantarum* suşlarının hem β-glukosidaz hem esteraz hem de proteaz genlerini taşıdığını, buna karşın *O. oeni* suşlarında sadece esteraz ve proteaz genlerinin tespit edildiğini ortaya koymuştur. Bu durum, *Lactiplantibacillus plantarum*'un şarap fermentasyonu açısından daha geniş spektrumlu bir aromatik potansiyel sunduğunu ve özellikle β-glukosidaz varlığıyla öne çıktığını göstermektedir (Lerm *et al.* 2019).

Konvensiyonel ve biyokimyasal testler

Çalışmada izole edilen bakteriyel suşların biyokimyasal karakterizasyonu amacıyla API 20E, API ZYM ve API 50 CH test kitleri kullanıldı (Şekil 20). Uygulanan testler sonucunda elde edilen biyokimyasal profiller, izolatların genel özellikleri hakkında bilgi sağlandı ve tür düzeyinde tanımlamaya yönelik ön değerlendirme yapıldı. Ancak, API sistemlerinin bazı sınırlılıkları nedeniyle fenotipik tanımlamaların kesinlik derecesi sınırlı kalabilmekte; bu nedenle ileri düzey moleküler tekniklerle (örneğin 16S rRNA gen dizilemesi) doğrulama yapıldı.

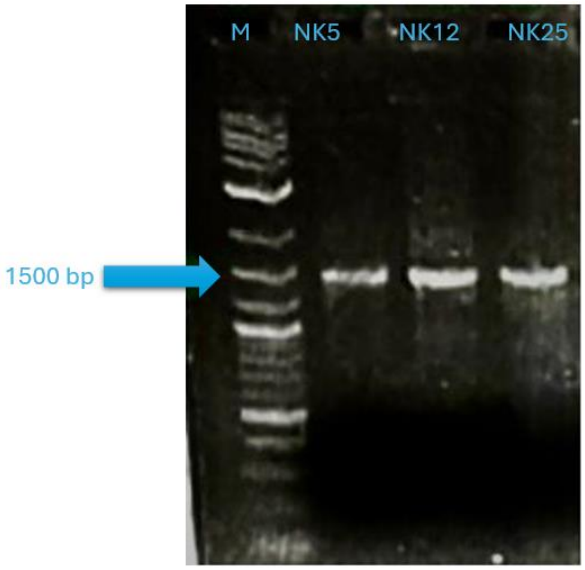


Şekil 20. A. NK12 izolatına ait API 20E görüntüsü; B. NK12 izolatına ait API ZYM görüntüsü; C. NK12 izolatına ait API 50 CH görüntüsü

Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Moleküler İdentifikasyonu

İzolatların 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılması

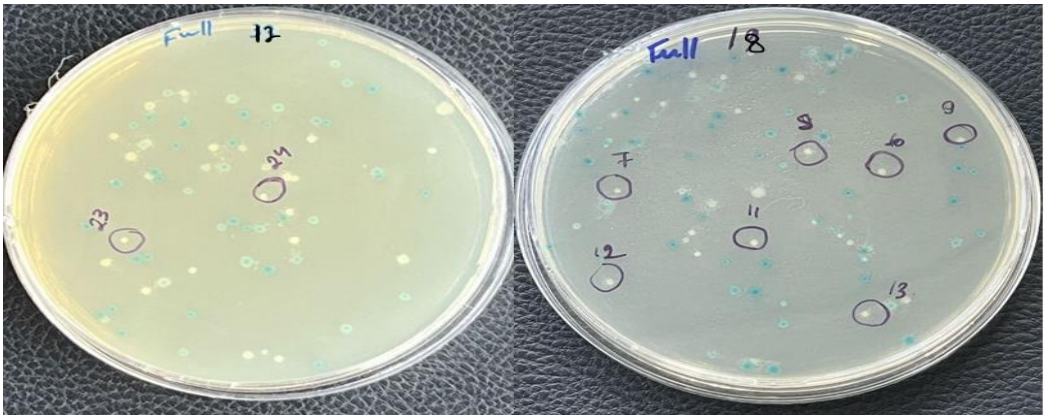
Toplanan şarap örneklerinden LAB izolasyonu gerçekleştirildikten sonra, yapılan deneylerde en iyi parametreleri sağlayan ve BA üretme yeteneğine PCR'lada yapılan genomik analiz sonucunda negatif olan 3 adet izolat (NK5, NK12 ve NK25) seçilerek DNA'ları ekstrakte edildi ve evrensel primer seti (27F-1492R) kullanılarak 16S rRNA gen bölgesi çoğaltıldı. Daha sonra elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. Sonuçta tüm izolatların 1500 bç büyüklüğünde tek bir bant içerdiği tespit edildi (Şekil 21).



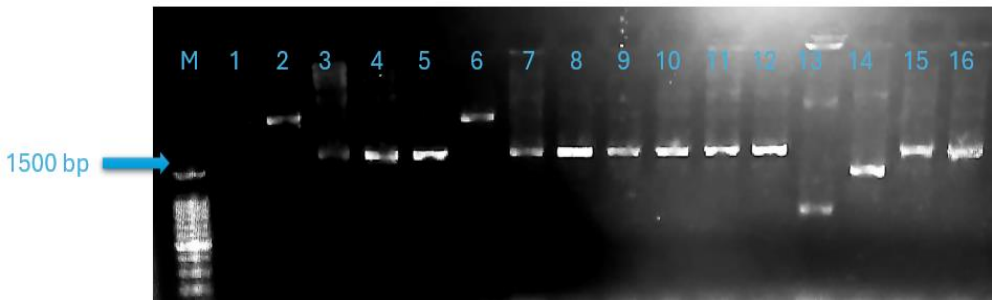
Şekil 21. NK5, NK12 ve NK25 izolatlarına ait 16S rRNA görüntüsü

16S rRNA gen bölgesinin klonlanması

İzolatların moleküler olarak identifiye edilebilmesi için; amplifiye edilen 16S rRNA gen bölgesinin nükleotid dizisini belirlemek için klonlama yapıldı. Bu kapsamda elde edilen 16S rRNA gen bölgesinin pGEM®-T Easy (Promega) vektörüne ligasyonu ve bu ligasyon ürünün uygun kompetent *E. coli* hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi. Analizin başarısı mavi-beyaz tarama ile belirlendi (Şekil 22). Mavi koloniler; 16S rRNA gen bölgesinin transformasyon aşamasında insert olmadığı, beyaz koloniler ise; 16S rRNA gen bölgesinin transformasyon aşamasında insert olduğu kolonileri işaret etti. Bunun doğruluğunu kanıtlamak için beyaz kolonilere koloni PCR işlemi uygulandı. PCR sonucunda bant profili doğru olan koloniler seçildi (Şekil 23) ve plazmit izolasyonu yapılarak, sekans analizi gerçekleştirildi (Macrogen, Hollanda).



Şekil 22. Mavi beyaz koloni petri görüntüsü



Şekil 23. İzolatların koloni PCR görüntüsü (8,10 ve 12 nolu örnekler pozitif olarak kabul edildi)

16S rRNA sekans analizi

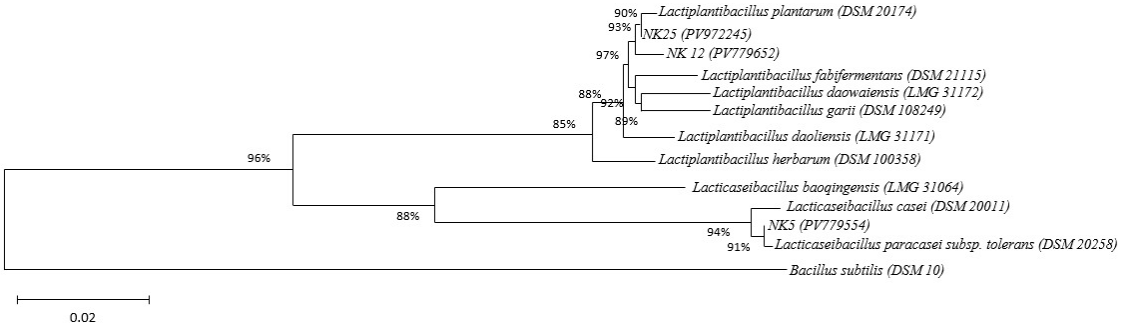
Bilinmeyen bir bakterinin 16S rRNA dizisinin belirlenmesi, bu bakterinin sınıflandırılması için gerekli olan genotipik bilginin ilk ve temel adımıdır. Bu amaçla ilk olarak, şarap örneklerinden izole edilen 3 adet LAB izolatın 16S rRNA genlerinin baz dizileri belirlendi ve belirlenen 16S rRNA gen dizileri, GenBank®'ta var olan diğer bakteriyal 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırıldı. Analizler sonucunda benzerlik gösterdiği tespit edildi. Bu kıyaslama sonucunda da eldeki üç izolatın 16S rRNA gen dizilerine göre tür isimleri ve benzerlik oranları belirlendi. Son olarak identifiye edilen bu izolatların verileri GenBank®' a girilerek, her bir izolat için accession numarası alındı (Tablo 11).

Tablo 11. İzolatların Gen Bank Numarası

İzolat kodu	Benzediği tür isimleri	Benzerlik oranı (%)	Genbank numarası
NK 5	*Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*	**99,87**	PV779554
NK 12	*Lactiplantibacillus argentoratensis*	**99,8**	PV779652
NK 25	*Lactiplantibacillus pentosus*	**99**	PV972245

Filo genetik ağaç

Moleküler düzeyde elde edilen 16S rRNA dizi verilerinin doğruluğu, tür tayini amacıyla kullanılan EzTaxon veritabanı üzerinden analiz edilerek doğrulandı. Buna ek olarak, izolatların taksonomik pozisyonlarını ve filogenetik düzeydeki benzerlik ilişkilerini ortaya koymak amacıyla, elde edilen baz dizileri MEGA 11 yazılımı ile analiz edilmiştir. Bu analiz kapsamında, Neighbour-Joining (NJ) algoritması kullanılarak, 16S rRNA gen dizilerine dayalı filogenetik ağaçlar oluşturularak, izolatların referans türlerle olan filogenetik yakınlık dereceleri Şekil 23'te görselleştirildi.



Şekil 24. LAB potansiyeli olan izolatlara ait 16S rRNA temelli filogenetik ağaç

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında ev yapımı şarap örneklerinden toplam 120 adet bakteri izole edildi. Yapılan konvensiyonel testler, 120 izolattan 85'inin potansiyel LAB olabileceğine işaret ederken çalışmalara bu 85 izolat ile devam edildi.

Hemolitik aktiviteleri açısından yapılan değerlendirmeler sonucunda 85 izolattan 29'unda hemolitik aktivite tespit edildiğinden, güvenli izolat olarak kabul edilebilecek diğer 56 izolat daha sonraki testler için seçildi.

Antibakteriyel aktivite testinde, değerlendirmeler sonucunda en yüksek inhibisyon bölgesi 20 mm ile NK17 izolatında gözlemlendi.

Antibiyotik duyarlılığı deneyinde 15 izolatın kullanılan antibiyotiklere hem duyarlı hem de dirençli olduğu belirlendi.

Yapılan güvenlik değerlendirmesi kapsamında gerçekleştirilen biyofilm oluşturma yeteneği değerlendirilmesi sonucunda izolatlardan %65,52'nin biyofilm oluşturmadığı belirlendi.

Biyojen amin üretimi açısından yapılan değerlendirmeler sonucunda 15 izolattan üçü Tiramin, ikisi Histamin, ikisi Tirozin ürettiği belirlendi.

GİS, düşük pH, yüksek safra ve etanol koşullarına yönelik yapılan tolerans testlerinde, çalışmada kullanılan tüm izolatların bu stres koşullarına karşı dirençli olduğu belirlendi.

Otolitik aktiviteleri açısından yapılan değerlendirmeler sonucunda izolatların %54,55'i iyi otolitik aktivite, %27,3'ü nispeten iyi otolitik aktivite ve %18,2'si düşük otolitik aktivite gösterdiği belirlendi. En yüksek otolitik aktiviteye NK5 (%66,59), en düşük otolitik aktivite ise NK4 (%3,2) izolatında tespit edildi.

Hücre yüzey hidrofobisi deneyinde elde edilen izolatlar arasından en iyi yapışma potansiyeline sahip olan izolat NK 12 (%64) olduğu belirlendi.

Asitleştirme yeteneği deneyi sonucunda, NK5, NK12, NK16, NK17, NK18, NK19 ve NK25 kodlu izolatların bulundukları ortamın pH'ını 1,5 ila 2 birim arasında düşürdükleri ve bu nedenle orta düzey asit üretme kapasitesine sahip oldukları belirlendi.

Antioksidan aktivite deneyi sonucunda en yüksek antioksidan kapasiteye NK5 (%75,7) izolatının sahip olduğu belirlendi.

Kolesterol asimilasyonu açısından yapılan değerlendirmeler sonucunda izolatların 24 saatlik inkübasyondan sonra *in vitro* asimile edilen kolesterol miktarı %1,42-%36,09 arasında değiştiği gözlemlendi.

Teknolojik özellikler açısından izolatların enzimatik aktivitesi deneyleri yapılmış ve sonuç olarak proteaz aktivitesi gösteren izolatlardan yalnız birinde lipaz aktivitesi gözlemlendi. Diğer enzimatik aktiviteler tespit edilmedi. API ZYM ve API 2OE kullanılarak deney sonuçları doğruluğu onaylandı.

Tüm parametreler sonucunda istenilen özelliklere sahip olan ve yüksek oranda potansiyel probiyotik organizma olabileceği düşünülen 3 adet izolatın (NK5 kodlu *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *pssssaracasei,* NK12 kodlu *Lactiplantibacillus argentoratensis* ve NK25 kodlu *Lactiplantibacillus pentosus*) patojen olmayan güvenli LAB'ler olduğu belirlendi.

Tez kapsamında belirtilen tüm parametrelerden pozitif sonuç alınan izolatların probiyotik olarak kullanım potansiyellerinin kanıtlanabilmesi için farklı parametrelerin de eklendiği daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Araştırma sonuçlarına göre; elde edilen üç mikroorganizmanın potansiyel probiyotik olduğu ve bunların gıda endüstrisi alanında kullanılabileceği düşünülmektedir. Ayrıca yapılması planlanan ilave çalışmalarla, bu dört izolatın gıda endüstrisinde kullanılabilirlikleri tescil edilecek ve patent aşamasına ulaşılması mümkün olabilecektir.

KAYNAKÇA

Adebo, O. A. (2020). African sorghum-based fermented foods: past, current and future prospects. *Nutrients, 12*(4), 1111. https://doi.org/10.3390/nu12041111

Adıgüzel, A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., Sachadyn-Król, M., & Varzakas, T. (2020). Lactic acid bacteria as antibacterial agents to extend the shelf life of fresh and minimally processed fruits and vegetables: Quality and safety aspects. *Microorganisms, 8*(6), 952. https://doi.org/10.3390/microorganisms8060952

Arık, G. (2018). *Çeşitli gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin (LAB) tanımlanması ve biyofilm oluşturma yetenekleri ile antibiyotik dirençliliklerinin araştırılması* (Doctoral dissertation, Bursa Uludag University (Turkey)).

Ashraf, R., & Smith, S. C. (2016). Commercial lactic acid bacteria and probiotic strains-tolerance to bile, pepsin and antibiotics. *International Food Research Journal*, *23*(2), 777.

Aziz, T., Xingyu, H., Sarwar, A., Naveed, M., Shabbir, M. A., Khan, A. A., ... & Jalal, R. S. (2023). Assessing the probiotic potential, antioxidant, and antibacterial activities of oat and soy milk fermented with Lactiplantibacillus plantarum strains isolated from Tibetan Kefir. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1265188. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1265188

Baltaci, M. O., Genc, B., Arslan, S., Adiguzel, G., & Adiguzel, A. (2017). Isolation and characterization of thermophilic bacteria from geothermal areas in Turkey and preliminary research on biotechnologically important enzyme production. *Geomicrobiology journal*, *34*(1), 53-62. https://doi.org/10.1080/01490451.2015.1137662

Barbieri, F., Montanari, C., Gardini, F., & Tabanelli, G. (2019). Biogenic amine production by lactic acid bacteria: A review. *Foods*, *8*(1), 17. https://doi.org/10.3390/foods8010017

Bartle, L., Sumby, K., Sundstrom, J., & Jiranek, V. (2019). The microbial challenge of winemaking: Yeast-bacteria compatibility. *FEMS Yeast Research, 19*(4), foz040. https://doi.org/10.1093/femsyr/foz040

Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Falah, F. (2021). Safety, probiotic properties, antimicrobial activity, and technological performance of *Lactobacillus* strains isolated from Iranian raw milk cheeses. *Food Science & Nutrition*, *9*(8), 4094-4107. https://doi.org/10.1002/fsn3.2365

Bhat, B., & Bajaj, B. K. (2020). Multifarious cholesterol lowering potential of lactic acid bacteria equipped with desired probiotic functional attributes. 3 Biotech, 10(5), 200. https://doi.org/10.1007/s13205-020-02183-8

Bintsis, T. (2018). Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS microbiology*, *4*(4), 665. https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665

Bokulich, N. A., Collins, T. S., Masarweh, C., Allen, G., Heymann, H., Ebeler, S. E., & Mills, D. A. (2016). Associations among wine grape microbiome, metabolome, and

fermentation behavior suggest microbial contribution to regional wine characteristics. *MBio*, *7*(3), 10-1128. https://doi.org/10.1128/mBio.00631-16

Buňková, L., Buňka, F., Hlobilová, M., Vaňátková, Z., Nováková, D., & Dráb, V. (2009). Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus, Lactococcus* and *Streptococcus. European Food Research and Technology*, *229*, 533-538. http://dx.doi.org/10.1007/s00217-009-1075-3

Byakika S, Mukisa IM, Byaruhanga YB, Muyanja C. Probiotic Potential of Lactic Acid Starter Cultures Isolated from a Traditional Fermented Sorghum-Millet Beverage. International Journal of Microbiology. 2020;1-8. https://doi.org/10.1155/2020/7825943

Byakika, S., & Mukisa, I. M. (2024). Microbial diversity, aflatoxin M1 contamination and potential lactic acid starters for commercially produced traditional fermented dairy beverages, a case of Bongo from Uganda. *International Dairy Journal*, *159*, 106069. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2024.106069

Cappello, M. S., Zapparoli, G., Logrieco, A., & Bartowsky, E. J. (2017). Linking wine lactic acid bacteria diversity with wine aroma and flavour. *International journal of food microbiology*, *243*, 16-27. http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110070

Colautti, A., Ginaldi, F., Camprini, L., Comi, G., Reale, A., & Iacumin, L. (2024). Investigating safety and technological traits of a leading probiotic species: *Lacticaseibacillus paracasei*. *Nutrients*, *16*(14), 2212. https://doi.org/10.3390/nu16142212

Coton, M., Romano, A., Spano, G., Ziegler, K., Vetrana, C., Desmarais, C., ... & Coton, E. (2010). Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiology*, *27*(8), 1078-1085. https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.012

Cui, Y., Wang, D., Zhang, L., & Qu, X. (2024). Research progress on the regulatory mechanism of biofilm formation in probiotic lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-15. https://doi.org/10.1080/10408398.2024.2400593

Çoşkun, Z. G., & Çoşkun, F. (2022). A Review about Honey Effect on Human Body. Journal of Apitherapy and Nature, 5(1), 35-68. https://doi.org/10.35206/jan.963498

Davis, C.R.; Wibowo, D.; Fleet, G.H.; Lee, T.H. Properties of wine lactic acid bacteria: Their potential enological significance. *Am. J. Enol. Vitic.* **1988**, *39*, 137–142. http://dx.doi.org/10.1023/A:1002088931106

Duche, R. T., Singh, A., Wandhare, A. G., Sangwan, V., Sihag, M. K., Nwagu, T. N., ... & Ezeogu, L. I. (2023). Antibiotic resistance in potential probiotic lactic acid bacteria of fermented foods and human origin from Nigeria. *BMC microbiology*, *23*(1), 142.

Eiteman, M. A., & Ramalingam, S. (2015). Microbial production of lactic acid. *Biotechnology letters*, *37*, 955-972.

Feng, Y., Qiao, L., Liu, R., Yao, H., & Gao, C. (2017). Potential probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from the intestinal mucosa of healthy piglets. *Annals of Microbiology*, *67*(3), 239-253. https://doi.org/10.1007/s13213-017-1254-6

Fernández, M., del Río, B., Linares, D. M., Martín, M. C., & Alvarez, M. A. (2006). Real-Time Polymerase Chain Reaction for Quantitative Detection of Histamine-Producing Bacteria: Use in Cheese Production. *Journal of Dairy Science*, *89*(10), 3763–3769. https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(06)72417-1

Fernández, M., Linares, D. M., & Alvarez, M. A. (2004). Sequencing of the Tyrosine Decarboxylase Cluster of Lactococcus lactis IPLA 655 and the Development of a PCR

Filimon, R. V., Bunea, C. I., Nechita, A., Bora, F. D., Dunca, S. I., Mocan, A., & Filimon, R. M. (2022). New malolactic bacteria strains isolated from wine microbiota:

characterization and technological properties. *Fermentation*, *8*(1), 31. https://doi.org/10.3390/fermentation8010031

Fossi, B. T., Ekabe, D. E., Toukam, L. L., Pambou, H. O. T., Gagneux-Brunon, A., Nguefeu, C. N., & Bongue, B. (2022). Probiotic lactic acid bacteria isolated from traditional cameroonian palm wine and corn beer exhibiting cholesterol lowering activity. *Heliyon*, *8*(11). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11708

Gao, J., Liu, Y. C., Wang, Y., Li, H., Wang, X. M., Wu, Y., ... & Qi, Z. L. (2020). Impact of yeast and lactic acid bacteria on mastitis and milk microbiota composition of dairy cows. *AMB Express*, *10*, 1-12. https://doi.org/10.1186/s13568-020-0953-8

Garbacz K. (2022). Anticancer activity of lactic acid bacteria. Seminars in cancer biology, 86(Pt 3), 356–366. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.12.013 https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.12.013

García-Ruiz, A., Bartolomé, B., Martínez-Rodríguez, A. J., Pueyo, E., Martín-Álvarez, P. J., & Moreno-Arribas, M. V. (2008). Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*, *19*(9), 835-841. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.08.018

Hatti-Kaul, R., Chen, L., Dishisha, T., & Enshasy, H. E. (2018). Lactic acid bacteria: from starter cultures to producers of chemicals. *FEMS microbiology letters*, *365*(20), fny213. https://doi.org/10.1093/femsle/fny213

Hossain, T. J. (2022). Functional genomics of the lactic acid bacterium *Limosilactobacillus* fermentum LAB-1: metabolic, probiotic and biotechnological perspectives. *Heliyon*, *8*(11). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11412

Hu, Y., Zhao, Y., Jia, X., Liu, D., Huang, X., Wang, C., ... & Lyu, Y. (2023). Lactic acid bacteria with a strong antioxidant function isolated from "Jiangshui," pickles, and feces. Frontiers in Microbiology, 14, 1163662. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1163662

Landete, J. M., De Las Rivas, B., Marcobal, A., & Muñoz, R. (2007). Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *International Journal of Food Microbiology*, *117*(3), 258-269. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.05.001

Lerm, E. The Selection and Characterisation of Lactic Acid Bacteria to Be Used as a Mixed Starter Culture for Malolactic Fermentation. Master's Thesis, Stellenbosch University, Department of Viticulture and Oenology, Faculty of AgriSciences, Stellenbosch, South Africa, 2010.

Ma, C., Zhang, L., Ma, D., Du, M., Han, X., Yi, H., ... & Song, W. (2012). Çin zanaatkar fermente sütlerinden izole edilen *Lactobacilli*'nin teknolojik karakterizasyonu. *Uluslararası süt teknolojisi dergisi*, *65* (1), 132-139. https://doi.org/10.3390/fermentation8120679

Marchwińska, K., & Gwiazdowska, D. (2022). Isolation and probiotic potential of lactic acid bacteria from swine feces for feed additive composition. *Archives of Microbiology*, *204*(1), 61. https://doi.org/10.1007/s00203-021-02700-0

Method for Detecting Tyrosine Decarboxylating Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food*

Molska, M., & Reguła, J. *Potential mechanisms of probiotics action in the prevention and treatment of colorectal Cancer. Nutrients. 2019; 11 (10): 2453*. https://doi.org/10.3390/nu11102453

Moreira, L., Milheiro, J., Filipe-Ribeiro, L., Cosme, F., & Nunes, F. M. (2024). Exploring factors influencing the levels of biogenic amines in wine and microbiological strategies

for controlling their occurrence in winemaking. *Food Research International*, 114558. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114558

Mtshali, P. S., Divol, B., Van Rensburg, P., & Du Toit, M. (2010). Genetic screening of wine-related enzymes in Lactobacillus species isolated from South African wines. Journal of Applied Microbiology, 108(4), 1389-1397. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04535.x

Mugwanda, K., Hamese, S., Van Zyl, W. F., Prinsloo, E., Du Plessis, M., Dicks, L. M., & Thimiri Govinda Raj, D. B. (2023). Recent advances in genetic tools for engineering probiotic lactic acid bacteria. *Bioscience Reports*, *43*(1), BSR20211299. https://doi.org/10.1042/BSR20211299

N Odu, N., O Amadi, L., & O Aguamah, E. (2021). Screening of Bacterial Isolates with Probiotic Potential of Tiger Nut Drink, Ogi and Palm Wine. http://dx.doi.org/10.9734/jalsi/2021/v24i730250

Nath S, Sikidar J, Roy M, Deb B. In vitro screening of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented milk product. Food Quality and Safety. 2020;213–223. https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyaa026

Nezhad, S. J. E., Dovom, M. R. E., Najafi, M. B. H., Yavarmanesh, M., & Mayo, B. (2020). Technological characteristics of Lactobacillus spp. isolated from Iranian raw milk Motal cheese. *LWT*, *133*, 110070. http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110070

Nieto-Arribas, P., Poveda, J. M., Seseña, S., Palop, L., & Cabezas, L. (2009). Technological characterization of Lactobacillus isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. *Food Control*, *20*(12), 1092-1098.Pot, B., & Tsakalidou, E. (2009). Taxonomy and metabolism of *Lactobacillus*. *Lactobacillus molecular biology: From genomics to probiotics*, *1*, 1-56. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.03.001

Obisesan, A. O., Abiodun, O. O., & Ayeni, F. A. (2024). Correction: Lactic acid bacteria isolated from women'breast milk and infants' faeces have appreciable immunogenic and probiotic potentials against diarrheagenic E. coli strains. *BMC microbiology*, *24*, 363. https://doi.org/10.1186/s12866-024-03545-5

Priya, P. S., Ashwitha, A., Thamizharasan, K., Harishkumar, M., Dinesh, S., Nithya, T. G., & Kamaraj, M. (2021). Synergistic effect of durian fruit rind polysaccharide gel encapsulated prebiotic and probiotic dietary supplements on growth performance, immune-related gene expression, and disease resistance in Zebrafish (*Danio rerio*). *Heliyon*, *7*(4). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06669

Protection, *67*(11), 2521–2529. https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(06)72417-1

Reuben, R. C., Roy, P. C., Sarkar, S. L., Alam, R. U., & Jahid, I. K. (2019). Isolation, characterization, and assessment of lactic acid bacteria toward their selection as poultry probiotics. *BMC microbiology*, *19*, 1-20. https://doi.org/10.1186/s12866-019-1626-0

Rodrigues, N. P. A., Garcia, E. F., & de Souza, E. L. (2021). Selection of lactic acid bacteria with promising probiotic aptitudes from fruit and ability to survive in different food matrices. *Brazilian Journal of Microbiology*, *52*(4), 2257-2269. https://doi.org/10.1007/s42770-021-00543-x

Rollán, G. C., Farías, M. E., & De Nadra, M. M. (1995). Characterization of two extracellular proteases from *Leuconostoc oenos*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 11, 153-155. https://doi.org/10.1007/bf00704637

Shah, A. B., Baiseitova, A., Zahoor, M., Ahmad, I., Ikram, M., Bakhsh, A., ... & Al-Zharani, M. (2024). Probiotic significance of Lactobacillus strains: A comprehensive review on

health impacts, research gaps, and future prospects. Gut Microbes, 16(1), 2431643. https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2431643

Sharma, A., & Lee, H. J. (2025). Antimicrobial Activity of Probiotic Bacteria Isolated from Plants: A Review. Foods, 14(3), 495. https://doi.org/10.3390/foods14030495

Sharma, N., Yadav, N., Bhagwani, H., Chahar, D., & Singh, B. (2018). Screening of lactic acid bacteria from effluent samples of jaipur dairy. *International Journal of Waste Resources*, *8*(332), 2. http://dx.doi.org/10.4172/2252-5211.1000332

Sharma, P., Tomar, S. K., Sangwan, V., Goswami, P., & Singh, R. (2016). Antibiotic resistance of *Lactobacillus sp*. isolated from commercial probiotic preparations. *Journal of Food Safety*, *36*(1), 38-51. https://doi.org/10.1111/jfs.12211

Shekarforoush, E., Jiang, X., Muhammed, M. K., Whitehead, K. A., Arneborg, N., & Risbo, J. (2022). Enzymatic modification and adsorption of hydrophobic zein proteins on lactic acid bacteria stabilize Pickering emulsions. *Food Research International*, *161*, 111783. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111783 +

Shukla, R., & Goyal, A. (2014). Probiotic potential of Pediococcus pentosaceus CRAG3: a new isolate from fermented cucumber. *Probiotics and antimicrobial proteins*, *6*(1), 11-21. https://link.springer.com/article/10.1007/s12602-013-9149-8

Soyer, P., Tekgöz, M., & Tunalı, Y. (2023). Determination of potential probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from colostrum milk. *European Journal of Life Sciences*, *2*(1), 31-38. https://doi.org/10.55971/EJLS.1263343

Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M. M., Campbell, K., Cheung, E., ... & Ralser, M. (2015). The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews*, *90*(3), 927-963. https://doi.org/10.1111/brv.12140

Su, J., Wang, T., Li, YY, Li, J., Zhang, Y., Wang, Y., ... & Li, H. (2015). Şarap laktik asit bakterilerinin antioksidan özellikleri: *Oenococcus oeni*. *Uygulamalı Mikrobiyoloji ve Biyoteknoloji*, *99* , 5189-5202. https://doi.org/10.3390/foods11060785

Succi, M., Coppola, F., Testa, B., Pellegrini, M., & Iorizzo, M. (2025). Alcohol or No Alcohol in Wine: Half a Century of Debate. *Foods*, *14*(11), 1854. https://doi.org/10.3390/foods14111854

Suissa, R., Oved, R., Jankelowitz, G., Turjeman, S., Koren, O., & Kolodkin-Gal, I. (2022). Molecular genetics for probiotic engineering: dissecting lactic acid bacteria. Trends in microbiology, 30(3), 293–306. https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.07.007 https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.07.007

Tamang, B., & Tamang, J. P. (2009). Lactic acid bacteria isolated from indigenous fermented bamboo products of Arunachal Pradesh in India and their functionality. Food Biotechnology, 23(2), 133-147. https://doi.org/10.1080/08905430902875945

Tilocca, B., Costanzo, N., Morittu, V. M., Spina, A. A., Soggiu, A., Britti, D., ... & Piras, C. (2020). Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. *Journal of Proteomics*, *210*, 103534. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103534

Virdis, C., Sumby, K., Bartowsky, E., & Jiranek, V. (2021). Lactic acid bacteria in wine: Technological advances and evaluation of their functional role. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 612118. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.612118

Wang, Y., Dong, J., Wang, J., Chi, W., Zhou, W., Tian, Q., ... & Wong, A. (2022). Assessing the drug resistance profiles of oral probiotic lozenges. *Journal of Oral Microbiology*, *14*(1), 2019992. https://doi.org/10.1080/20002297.2021.2019992

Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., ... & Geng, W. (2021). Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, *9*, 612285. https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285

Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C. R., Fleet, G. H., & Lee, T. H. (1985). Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, *36*(4), 302-313.

Wittouck, S., Wuyts, S., Meehan, C. J., van Noort, V., & Lebeer, S. (2019). A genome-based species taxonomy of the *Lactobacillus* genus complex. *MSystems*, *4*(5), 10-1128. https://doi.org/10.1128/msystems.00264-19

Wood, B. J., & Holzapfel, W. H. N. (Eds.). (1995). *The genera of lactic acid bacteria* (Vol. 2). Springer Science & Business Media.

Xie, Z., McAuliffe, O., Jin, Y. S., & Miller, M. J. (2024). Genomic Modifications of Lactic Acid Bacteria and Their Applications in Dairy Fermentation. *Journal of Dairy Science*.

Yılmaz-Yıldıran, H., Karahan, A. G., & Başyiğit-Kılıç, G. (2015). Laktik asit bakterilerinde çoğunluğu algılama mekanizması. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, *72*(1),

Yiğit, M. B. (2023). *Determination of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditional food products* (Master's thesis, Abdullah Gül Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü).

Zhang, Q., Wang, M., Ma, X., Li, Z., Jiang, C., Pan, Y., & Zeng, Q. (2022). In vitro investigation on lactic acid bacteria isolatedfrom Yak faeces for potential probiotics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*, 984537. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.984537

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., ... & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *70*(4), 2782-2858. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Narmin KARİMOVA
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	
Lisans:	
Yüksek lisans:	
Yabancı Dil Bilgisi	
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
Tezden Üretilmiş Yayınlar	