

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Lactococcus lactis subsp. *lactis* LL27 SUŞUNUN PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİ

Dilek KAYA ÖZDOĞAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2011

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Lactococcus lactis subsp. *lactis* LL27 SUŞUNUN PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİ

Dilek KAYA ÖZDOĞAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Bu çalışmada; Türkiye kökenli Nisin A üreticisi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun probiyotik özelliklerinin belirlenmesi için, antimikrobiyel aktivite, antibiyotik dirençlilik düzeyi, mide asitliğine direnç, bağırsak sisteminde yaşamda kalma kabiliyeti, bağırsak epiteline tutunma yeteneği, bağırsak patojenleri ile epitel hücrelerine tutunmada yarışmacı olup olmadığı incelendi ve suşun yüksek düzeyde probiyotik potansiyeli taşıdığı sonucu elde edildi. Tutunma denemeleri sonucunda *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun Caco-2 ve CCL-221 bağırsak hücrelerinin her ikisine de tutunma özelliği gösterdiği ve LL27 suşunun tutunma oranının kullanılan hücre tiplerine göre değiştiği belirlendi. LL27 suşunun *S. Typhimurium* SL1344 ve *E. coli* ETEC bakterilerinin, Caco-2 hücrelerine tutunmalarını sırasıyla % 45.41 ve % 73.69 oranında inhibe ettiği belirlendi. Ayrıca bu suşun yüksek hidrofobisite (% 83.48±1.45) özelliğine sahip olduğu tespit edildi. *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun DPPH süpürme kapasitesi (% 75±3) ve demir iyonu şelatlama aktivitesi (% 29.5±3) bulgularına göre LL27 suşunun bağırsak mukozasındaki oksidatif strese karşı koyabileceği sonucuna varıldı.

Ocak 2011, 62 Sayfa

Anahtar Kelimeler: *L. lactis* subsp. *lactis* LL27, probiyotik, Caco-2 hücreleri, yarışmacı tutunma

ABSTRACT

Master Thesis

PROBIOTIC PROPERTIES OF *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL27

Dilek KAYA ÖZDOĞAN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

In this study, antimicrobial activity, antibiotic resistance level, resistance to stomach acidity, viability in intestinal system, adhesion ability to intestinal epithelium, possibility of being a competitor with intestinal pathogens in adhesion to epithelium cells were studied to determine the probiotic properties of the Turkey originated strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL27 which is the Nisin A producer; and, this strain was determined as having high level of probiotic potential. As a result of adhesion experiments, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL27 exhibited adhesion properties to both Caco-2 and CCL-221 intestinal cells and it is determined that the adhesion rate of the strain LL27 changed according to cell types that used. This strain inhibited the adhesion rate of *S. Typhimurium* SL1344 and *E. coli* ETEC strains at a level of % 45.41 and % 73.69, respectively. We also determined that the strain had a high hydrophobicity property (% 83.48 ± 1.45). According to the DPPH scavenging capacity (% 75 ± 3) and iron ion chelating activity (% 29.5 ± 3) of the *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 it was concluded that LL27 strain could resist against the oxidative stress of intestinal mucosa.

January 2011, 62 pages

Key Words: *L. lactis* subsp. *lactis* LL27, probiotic, Caco-2 cells, competitive adhesion

TEŞEKKÜR

Bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, yakın ilgi ve desteğini her zaman hissettiğim danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi)’e; tezime sağladığı katkılarından dolayı Prof. Dr. Belma Aslım (Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi)’a;

Çalışmam süresince yardım ve destekleriyle yanımda olan, enerjileriyle ve güler yüzleriyle laboratuvar çalışmalarımı eğlenceli kılan başta Arş. Gör. Nefise AKKOÇ olmak üzere tüm laboratuvar arkadaşlarıma;

Lisansüstü eğitimim için beni teşvik eden ve tez çalışmam süresince bana uygun çalışma ortamı sağlayan Toprak Gübre ve Su Kaynakları Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürü Sayın Dr. Bülent SÖNMEZ’e ve çalışma arkadaşlarıma;

Tükenmeyen sevgi, fedakarlık ve destekleriyle tüm yaşamımda ve elbette eğitimim süresince benimle olan sevgili anneme, babama ve biricik ablama;

Çalışmam boyunca sabırla ve gayretle bıkmadan benimle ilgilenen, yaşamımı mutluluk ve huzur içinde devam ettirmemi sağlayan canım eşime;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dilek KAYA ÖZDOĞAN
Ankara, Ocak 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1 <i>Lactococcus</i> Cinsinin Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması.....	3
2.2 Probiyotikler.....	5
2.2.1 Probiyotiklerin tanımı ve tarihçesi.....	5
2.2.2 Probiyotik mikroorganizma seçim kriterleri.....	8
2.2.2.1 Güvenilirlik kriterleri.....	8
2.2.2.2 Teknolojik kriterler.....	8
2.2.2.3 Fonksiyonel kriterler.....	9
2.2.2.3.1 Asitlik ve safra tuzlarına direnç.....	9
2.2.2.3.2 Bağırsak epiteline tutunabilme ve sindirim sisteminde kolonizasyon.....	10
2.2.2.3.3 Antimikrobiyel aktivite.....	10
2.2.3 Probiyotik insan sağlığı üzerine mikroorganizmaların etkileri.....	13
2.2.3.1 Diyare üzerine etkileri.....	13
2.2.3.2 Laktoz intolerans üzerine etkileri.....	14
2.2.3.3 Bağışıklık sistemi üzerine etkileri.....	14
2.2.3.4 Kolesterol düşürücü etkileri.....	15
2.2.3.5 Antikarsinojenik etkileri.....	16
2.2.4 Probiyotiklerin etki mekanizmaları.....	18
3.MATERYAL ve YÖNTEM.....	20

3.1 Materyal.....	20
3.1.1 Bakteriler.....	20
3.2 Yöntem.....	20
3.2.1 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LL27 suşunun antimikrobiyel aktivitesi.....	20
3.2.2 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LL27 suşunun antibiyotik duyarlılık düzeyinin belirlenmesi.....	23
3.2.3 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LL27 suşunun düşük pH, pepsin, pankreatin ve safra tuzlarına karşı direncinin belirlenmesi.....	24
3.2.4 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LL27 suşunun Caco-2 ve CCL-221 hücrelerine tutunması.....	26
3.2.5 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LL27 suşunun patojen bakterilerin Caco-2 hücrelerine tutunmalarını engellemesi.....	28
3.2.6 Hidrofobisite.....	29
3.2.7 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LL27 suşunun antioksidan etkisi.....	30
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	32
4.1 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LL27 Suşunun Antimikrobiyel Aktivitesi.....	32
4.2 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LL27 Suşunun Antibiyotik Duyarlılık Düzeyinin Belirlenmesi.....	35
4.3 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LL27 Suşunun Düşük pH, Pepsin, Pankreatin ve Safra Tuzlarına Karşı Direncinin Belirlenmesi.....	39
4.4 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LL27 Suşunun Caco-2 ve CCL-221 Hücrelerine Tutunması.....	42
4.5 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LL27 Suşunun Patojen Bakterilerin Caco-2 Hücrelerine Tutunmalarını Engellemesi.....	47
4.6 Hidrofobisite.....	48
4.7 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LL27 Suşunun Antioksidan Etkisi.....	49
5. SONUÇ.....	51
KAYNAKLAR.....	52
ÖZGEÇMİŞ.....	62

SİMGELER DİZİNİ

µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
nm	Nanometre
µm	Mikrometre
mm	Milimetre
mM	Mikromolar
µg	Mikrogram
mg	Miligram
g	Gram
rpm	Dakikada devir sayısı
kob/mL	Mililitredeki koloni oluşturma birimi
v/v	Hacim/hacim
w/v	Ağırlık/hacim
Log	Logaritma
CO ₂	Karbondioksit
PBS	Tamponlanmış fosfat çözeltisi
OD	Optik yoğunluk

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> suşunun kuyu difüzyon testi sonucu farklı indikatör bakterilere karşı belirlenen antimikrobiyel etkinliği.....	34
Şekil 4.2 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> suşunun antibiyotik duyarlılık profili.....	38
Şekil 4.3 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> suşunun Caco-2 hücrelerine tutunması.....	44
Şekil 4.4 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> suşunun CCL-221 hücrelerine tutunması.....	44
Şekil 4.5 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> suşunun Caco-2 hücrelerine tutunmasının SEM görüntüsü.....	45
Şekil 4.6 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> suşunun CCL-221 hücrelerine tutunmasının SEM görüntüsü.....	46
Şekil 4.7 <i>E.coli</i> ETEC ve <i>S. Typhimurium</i> SL1344 suşlarının tutunma oranları.....	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 <i>Lactococcus</i> cinsinin sınıflandırılması.....	4
Çizelge 2.2 Probiyotik üretimde kullanılan mikroorganizmalar.....	7
Çizelge 2.3 Laktokoklar tarafından üretilen bakteriyosinlere bazı örnekler.....	12
Çizelge 2.4 Yaygın olarak kullanılan probiyotik bakteriler ve klinik çalışmalarla belirlenen etkileri.....	17
Çizelge 4.1 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> suşunun antimikrobiyel aktivitesi.....	33
Çizelge 4.2 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> suşunun antibiyotik duyarlılık profili.....	37
Çizelge 4.3 Antibiyotiklerin minimum inhibisyon konsantrasyonları.....	38
Çizelge 4.4 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> suşunun düşük pH koşullarındaki canlılık düzeyi.....	39
Çizelge 4.5 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> suşunun pepsin varlığındaki canlılık düzeyi.....	39
Çizelge 4.6 <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> suşunun pankreatin ve safra tuzu varlığındaki canlılık düzeyi.....	41

1. GİRİŞ

Belirli miktarlarda tüketildiğinde bağırsak florasını düzenleyerek konakçı sağlığı üzerinde olumlu etkilere neden olan mikrobiyel gıda katkıları “probiyotik” olarak tanımlanmaktadır. Probiyotiklerin tüketici sağlığı üzerinde yarattığı etkilerin araştırıldığı mikroorganizma gruplarının başında laktik asit bakterileri gelmektedir. Laktokokların da içinde bulunduğu laktik asit bakterileri, bağırsak sistemi mikroflorasının dengesinin korunmasında anahtar rol oynamaktadır (Fuller 1989, Reid ve Bocking 2003). Diyet, stres, gebelik önleyici uygulamalar ve mikrobiyel enfeksiyonlar sonucu, özellikle laktobasiller ve bifidobakterilerin popülasyonunda düşme meydana gelmekte ve sindirim sistemi mikrobiyel florasının dengesi bozulmaktadır (Hosel ve Altwein 2005). Laktik asit bakterileri, patojenik mikroorganizmaların kolonizasyonunu engellemek suretiyle bağırsak sistemi florasının dengede tutulmasında anahtar rol oynamaktadır. Bu bakterilerde patojen mikroorganizmalara karşı ana savunma mekanizmaları, epitelyal yüzeylere yarışmacı tutunma, hidrojen peroksit ve bakteriyosin üretim özellikleridir (Boris ve Barbes 2000, Reid ve Burton 2002, Brink vd. 2006).

Laktokoklar, başta tüm dünyada endüstriyel üretimi yapılan 500’e yakın peynir türü olmak üzere, çok sayıda fermente süt ürününün eldesinde starter kültür suşları olarak kullanılmaktadır. *Lactococcus lactis* süt teknolojisinde kullanılan en önemli starter bakteri türüdür. Laktokokların probiyotik karakteristikleri üzerinde yapılan sınırlı sayıda çalışma insan kökenli suşlarla yürütülmüştür. Bu çalışmalarda elde edilen veriler bazı suşların gastrointestinal sistemin stres koşullarında canlılığını sürdürebildiğini ve düşük düzeyde de olsa, bağırsak epiteli hücrelerine tutunmada patojenlerle yarışabildiğini göstermiştir (Caridi 2002, Todorov ve Dicks 2005, Todorov vd. 2007). Laktokokların insan kaynaklı suşları yanında, çiğ süt ve fermente süt ürünlerinden izole edilen suşlarının da probiyotik özelliklerinin tanımlanması, starter kültür suşu seçiminde kritik bir önem taşımaktadır. Gıda kökenli laktokok suşlarının özellikle çiğ süt ve fermente süt ürünleri ile yüksek düzeyde tüketimi, bağırsak florasına adaptasyonlarını artıran temel kriterdir (Delgado vd. 2007, Parracho vd. 2007). Diğer yandan değişik destek

materyalleri ile gıda sisteminde kullanılmaları halinde söz konusu tutunma karakteristikleri artırılabilir (Kim vd. 2006).

Probiyotik bakterilerin gıda ve sağlık alanındaki önemi bu alanda kullanılacak yeni bakteri suşlarının araştırılması gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır. Laktokokların süt ve süt ürünlerinde, doğal olarak yaygın bulunması, antimikrobiyel özellik göstermesi ve bakteriyosin üretme potansiyellerinin yüksek olması gibi sebepler göz önüne alınarak bu tez çalışmasında gıda kökenli bir nisin üreticisi olan *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun in-vitro gastrointestinal sistem koşullarında yaşamda kalması, Caco-2 hücrelerine yarışmacı tutunması, hidrofobisite karakteristikleri ve antioksidan etkisi saptanarak, probiyotik karakteristiklerinin tanımlanması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 *Lactococcus* Cinsinin Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması

Lactococcus cinsi (laktokoklar); Laktik Asit Bakterileri (LAB) grubunda yer alan, Gram-pozitif, katalaz-negatif, spor oluşturmeyen, hareketsiz, fakültatif anaerob ve tek (0,5–1,5 µm), çiftler ya da kısa zincirler halinde bulunabilen kok şekilli bakterilerdir. β hemolitik aktiviteleri yoktur fakat zayıf α hemolitik aktiviteye sahiptirler (Casalta ve Montel 2008). Enerji eldeleri, sütün fermentasyonu sonucunda laktozu homofermentatif yolla laktik aside dönüştürmeleri şeklindedir (Schleifer 1987, Schlegel 1997, Furet vd. 2002). Laktokoklar bu metabolik yol ile şeker molekülünden az miktarda enerji elde edebilmektedirler. Enerji kazanımlarını yeterli seviyeye getirebilmek için, bu metabolik yolu çok hızlı bir şekilde kullanırlar. Bu durum sonucunda süt ürünlerinde hızlı asidifikasyon meydana gelmektedir. Laktokoklar, vitaminler ve aminoasitler gibi metabolitler için çok sınırlı bir anabolizmaya sahiptirler. Bu nedenle vitaminler ve aminoasitler gibi gelişme faktörlerinin büyük bir kısmını çevreden sağlamaktadırlar (Schleifer 1987, Furet vd. 2002). Laktokokların optimum gelişme sıcaklıkları 30 °C dir. 10 °C'nin altında ve 45 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda, % 6.5 NaCl varlığında ve ortam pH'sının 9.6 olması durumunda gelişemezler (Stiles ve Holzapfel 1997). Lancelfield serolojik grup N üyesi olan *Lactococcus* cinsine ait bakterilerde fonksiyonel sitrik asit döngüsü ve solunum enzimleri bulunmamaktadır. Ancak bu bakteriler, düşük oranda oksijeni flavin tip NADH oksidaz, NADH peroksidaz ve süperoksit dismutaz enzimlerine sahip oldukları için kullanabilmektedirler. Katalaz enzim sistemleri olmadığından, aerobik koşullarda hidrojen peroksit ortamda birikebilmekte ve hücresel yapıların bozulmasına yol açarak bakteriyel gelişimi engelleyebilmektedir. Flavın tip NADH oksidazlar ve NADH peroksidazlar, düşük düzeyde hidrojen peroksit redüksiyonunu gerçekleştirdikleri için, laktokoklar mikroaerofilik olarak tanımlanmaktadır. % G+C oranı 34–42 arasında değişim gösteren laktokokların genom büyüklükleri ortalama 2.5 Mega baz (Mb)'dır. (Teixeria vd. 1996, Schlegel 1997, van Niel vd. 2002).

Laktokoklar; Schleifer ve arkadaşları (1985) tarafından *Streptococcus* ve *Lactobacillus* cinslerinin bazı türlerinin yeniden sınıflandırılması ile ortaya çıkmış ve bu cins 16 S rRNA dizileri ile doğrulanan kemotaksonomik çalışmalara dayanılarak doğrulanmıştır. (Schleifer ve Killper-Bälz 1987, Collins vd. 1989, Casalta ve Montel 2008). Birçok Lancefield grup N laktik asit bakterileri *Streptococcus* cinsinden *Lactococcus* cinsine transfer olmuştur (Schleifer vd. 1985, Stiles ve Holzapfel 1997).

Çizelge 2.1 *Lactococcus* cinsinin sınıflandırılması (Casalta ve Montel 2008)

Türler	Alttürler
<i>Lactococcus garvieae</i>	-
<i>Lactococcus piscium</i>	-
<i>Lactococcus plantarum</i>	-
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	-
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>hordniae</i>
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>

Laktokoklar genellikle bitkilerde ve hayvanların derilerinde bulunurlar. *L. garvieae* balıklardan, hayvanlardan ve süten, *L. piscium* somon balığından, *L. plantarum* çoğunlukla bitkilerden izole edilmektedir. *L. raffinolactis* nadiren çiğ sütte ve peynirlerde bulunur (Williams vd. 1990, Casalta ve Montel 2008). *L. lactis* subsp. *cremoris* ve *L. lactis* subsp. *lactis* çoğunlukla çiğ süt, peynir ve diğer süt ürünlerinde bulunur. Bu iki alttür genellikle üretimin ilk günü yüksek seviyelere ulaşır ve bunu çiğ süt peynirlerinin olgunlaşması süresince devam ettirir (Casalta ve Montel 2008).

L. lactis'in alttürleri laktik asit bakterilerinin ticari olarak en yaygın kullanılanları ve bu nedenle en önemli olanlarıdır. Bu türe ait alt türler özellikle süt endüstrisinde kullanılan mezofilik starter kültürler arasında en çok tercih edilen bakterilerdir. Fizyolojik, biyokimyasal özellikleri ve gıdalar üzerine etkileri yaygın olarak çalışılmaktadır (Teuber vd. 1991, Stiles ve Holzapfel 1997). *L. lactis* subsp. *lactis*, arjinin hidrolizi sonucu amonyak oluşturma ve 40 °C'de gelişebilme yetenekleriyle, *L. lactis* subsp. *cremoris*'den ayrılmaktadır (Klijn vd. 1991, Salama vd. 1991, Stiles ve Holzapfel 1997).

L. lactis türü başta olmak üzere *Lactococcus* cinsinin üyelerinin çoğunluğu insan ve hayvan sağlığı açısından tüketilmelerinde sakınca bulunmayan güvenilir mikroorganizmalar (GRAS) olarak sınıflandırılmaktadır (Salminen vd. 1998).

L. lactis subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris* süt fermentasyonu için starter kültür olarak tek başlarına ya da diğer laktik asit bakterileri ile kombine halde uzun zamandır kullanılmaktadır (Beresford vd. 2001, Casalta ve Montel 2008). Süt fermentasyonundaki asıl görevleri L-laktik asit üreterek asidifikasyonu sağlamaktır. Bunun yanı sıra organik asit ve nisin gibi çeşitli bakteriyosinleri üretme yeteneklerinden dolayı gıdaların korunması amacı ile de yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Delves-Broughton vd. 1996, Casalta ve Montel 2008).

Laktokoklar üzerindeki genetik çalışmalar endüstriyel üretim süreçlerinde kritik öneme sahip laktik fermentasyon süreçleri, kazein yıkımı, sitrattan diasetil üretimi ve faj ataklarına direnç başlıkları üzerinde yoğunlaşmaktadır. Laktokokar tarafından üretilen ve genellikle yakın akraba türler üzerinde inhibisyon etkinliğine sahip protein yapıda olan bakteriyosinler en geniş çalışma alanına sahip konudur. *L. lactis* suşları *Clostridium botulinum* ve sporlarının da dahil olduğu Gram-pozitif bakterilere karşı etkili ve en önemlisi nisin olan çeşitli bakteriyosinler üretmektedir (Stiles ve Holzapfel 1997).

2.2 Probiyotikler

2.2.1 Probiyotiklerin tanımı ve tarihçesi

Probiyotik kelimesi Latince ‘yaşam için’ anlamına gelen ‘biotikos’ dan türetilmiş ve ilk defa 1965 yılında, Lilly ve Stillwell adlı araştırmacılar tarafından, diğer mikroorganizmaların gelişimini destekleyen maddeleri tanımlamak için kullanılmıştır (Parracho vd. 2007). Probiyotikler ve sağlık üzerine olumlu etkileri ile ilgili ilk çalışma 19. yüzyılın sonlarında Rus bilim adamı Metchnikoff tarafından gerçekleştirilmiştir. Metchnikoff bağırsak mikroflorası üzerine yaptığı yoğun çalışmalar sonucunda fermente süt ürünlerinin vücutta bulunan toksik bir maddeden zehirlenmeyi

engellediğini öne sürmüştür (Metchnikoff 1907, Fuller 1989, Gismondo ve Drago 1999).

Probiyotikler, tüketicinin sağlığına bağırsak mikrobiyel florasını koruyarak ve geliştirerek yarar sağlayan, canlı mikrobiyel gıda katkıları olarak tanımlanmaktadır (Fuller 1989, Saarela vd. 2000). Probiyotik kelimesini Avrupalı bilim insanları, vücuda alındığında konakçının gastrointestinal mikroflorasına olumlu etkileri olan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlayarak son şeklini vermişlerdir (Kneifel vd. 1999).

Probiyotikler, fermente gıda ürünlerinden, eczacılık preparatlarına kadar geniş bir kullanım alanına sahiptir (Salminen vd. 1998). Probiyotik bakteri kültürlerinin kullanımı, istenilen mikroorganizmaların gelişmesini uyarmak ve potansiyel zararlı bakterilerin gelişmesini engellemek suretiyle vücudun doğal korunma mekanizmasını güçlendirmek şeklindedir (Saarela vd. 2000).

Laktik asit bakterileri probiyotik mikroorganizmaların en önemli grubunu oluşturmaktadır. Bunların içerisinde *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türleri en yaygın olarak kullanılan probiyotik mikroorganizmalardır. Bunların yanı sıra bazı bakteri cinsleri ile maya ve küf türlerinden de probiyotik ürünlerin hazırlanmasında yararlanılmaktadır (Çizelge 2.2) (Billoo vd. 2006, Kim vd. 2006).

Çizelge 2.2 Probiyotik üretiminde kullanılan mikroorganizmalar (Salminen vd. 1998)

<i>Lactobacillus</i> türleri	<i>Lactobacillus cellobiosus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus reuteri</i> <i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus johnsonii</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus salivarius</i> <i>Lactobacillus gasseri</i>
<i>Bifidobacterium</i> türleri	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium thermophilum</i>
<i>Bacillus</i> türleri	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus lentus</i>	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus coagulans</i>
<i>Pediococcus</i> türleri	<i>Pediococcus cerevisiae</i> <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i>	
<i>Streptococcus</i> türleri	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>Streptococcus intermedius</i>	<i>thermophilus</i>
<i>Bacteriodes</i> türleri	<i>Bacteriodes capillus</i> <i>Bacteriodes suis</i>	<i>Bacteriodes ruminicola</i> <i>Bacteriodes amylophilus</i>
<i>Propionibacterium</i> türleri	<i>Propionibacterium shermanii</i> <i>Propionibacterium freudenreichii</i>	
<i>Leuconostoc</i> türleri	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>	
Küfler	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i>	
Mayalar	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida torulopsis</i>	

2.2.2 Probiyotik mikroorganizma seçim kriterleri

Probiyotik mikroorganizmaların seçim kriterleri; güvenilirlik, teknolojik ve fonksiyonel yönler olmak üzere üç temele dayandırılmaktadır.

2.2.2.1 Güvenilirlik kriterleri

Probiyotik kullanım amacıyla yeni cins ve türlerin seçiminde, FAO/WHO tarafından önerilen uyulması zorunlu güvenlik kriterlerine dikkat edilmesi gerekmektedir. Güvenilirlikle ilgili kriterler aşağıdaki spesifikasyonları içermektedir (Saarela vd. 2000):

- İnsanların tüketeceği gıdaların üretiminde kullanılacak suşların insan orijinli olması tercih edilmelidir. İnsan orijinli olmamasına rağmen *Saccharomyces boulardi* insanların tüketimi için kullanılmaktadır. Buna karşın türe bağlı olarak ortaya çıkabilecek problemlerden sakınmak açısından bu özellik önem taşımaktadır.
- Patojenik bir geçmişe sahip olmamalıdır. Suş, patojenik suşların da dahil olduğu bir türe ait ise kullanılmadan önce detaylı klinik araştırmaları yapılmalıdır.
- Gastrointestinal hastalıklarla ve endokard enfeksiyonlarıyla ilişkili olmamalıdır.
- Suşun kesin hatlarla tanısının yapılmış olması gereklidir.
- Aktarılabılır antibiyotik direnç geni taşımamalıdır.

2.2.2.2 Teknolojik kriterler

Probiyotik suşların seçiminde birçok teknolojik yön de göz önünde bulundurulmalıdır (Saarela vd. 2000). Bu teknolojik kriterler:

- Faj dirençlilik ve genetik stabiliteye sahip olmalı,
- Üründe ve depolama sırasında stabil kalabilmeli,
- Ürün tadına olumsuz etkide bulunmamalı,
- Büyük ölçekte üretime uygun olmalı,
- Üretim süresince canlı kalabilmelidir.

2.2.2.3 Fonksiyonel kriterler

Probiyotiklerin fonksiyonel gereklilikleri, in-vitro metodlar kullanılarak ve bu çalışmaların sonuçları in-vivo çalışmalarla kontrol edilerek kanıtlanmalıdır. Probiyotik bir suş seçilirken aşağıdaki fonksiyonel yönler göz önüne alınmalıdır (Saarela vd. 2000):

- Epitel yüzeye tutunabilmeli ve insan gastrointestinal sisteminde sürekli kalabilmeli,
- İmmün sistemi uyarmalı fakat proinflammatuar etkisi olmamalı,
- Patojenlere karşı antimikrobiyel etkiye sahip olmalı,
- Aside ve insan mide suyuna dirençli olmalı,
- Safra tuzlarına dirençli olmalıdır.

2.2.2.3.1 Asitlik ve safra tuzlarına direnç

Bir mikroorganizmanın probiyotik özelliklerini gösterebilmesi için intestinal sistemde ve üretim süreçlerinde canlı kalması gerekmektedir. Ağız yolu ile alınan probiyotikler, intestinal sisteme ulaşmadan, öncelikli savunma mekanizmasını oluşturan midenin gastrik asit ortamından (pH 1.5-3.0) etkilenmeden canlı olarak geçmesi gerekmektedir (Dunne vd. 2001). Bu nedenle probiyotik mikroorganizma seçiminde aranması gereken en önemli kriterlerden biri suşların asit dirençlilikleridir.

Laktik asit bakterilerinin, probiyotik olarak kullanımlarını değerlendirmek için dikkate alınması gerekli özelliklerinden biri de suşların safra tuzlarına dirençlilikleridir (Lee ve Salminen 1995, Dunne vd. 2001). Safra tuzları, kolesterolün suda çözünebilen son ürünüdür. Safra asitleri karaciğerde, kolesterolden sentezlenerek safra kesesine iletilmekte, oradan da konjuge formda günde 500-700 mL miktarında ince bağırsağa salgılanmaktadır (Hoffman vd. 1983). Daha sonra kalın bağırsağa geçen safra asitleri, burada mikrobiyel aktivite sonucu tamamen kimyasal değişimlere (dekonjugasyon, dehidroksilasyon, dehidrojenasyon ve deglukuronidasyon) uğramaktadır (Hill ve Draser 1968, Hylemon ve Glass 1983). Safra asitlerinin konjuge olan ve olmayan formları

mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyel etkiye sahiptir. Bu inhibe edici etki konjuge olmayan formlarda yüksek olmakla birlikte Gram-pozitif mikroorganizmalar üzerinde yüksek düzeyde etkilidir (Floch vd. 1972, Dunne vd. 2001).

2.2.2.3.2 Bağırsak epiteline tutunabilme ve sindirim sisteminde kolonizasyon

Probiyotiklerin bağırsak yüzeyine tutunmak suretiyle bağırsaklarda geçici olarak kolonize oldukları düşünülmektedir. Bu nedenle bakterilerin bağırsak hücrelerine tutunma yetenekleri probiyotik suşların seçiminde önemli bir kriter olarak benimsenmiştir (Brassart vd. 1994, Tuomola ve Salminen 1998). Bağırsaklara ulaşan probiyotik mikroorganizmaların peristaltik hareketler ile bağırsaktan kayıp gitmemesi için bağırsak lümenini örten mukus tabakasına ve epitel hücrelerine yapışması gerekmektedir (Fernandez vd. 2003).

Probiyotik mikroorganizmaların bağırsak epitelinde kolonize olabilmeleri, patojen mikroorganizmaların tutunmasını engellemede, immün sistemin düzenlenmesinde, zarar gören mukozanın iyileştirilmesinde ve uzun süreli, daha etkin probiyotik etki sağlayabilmede kritik önem taşımaktadır (Ross vd. 2002).

2.2.2.3.3 Antimikrobiyel aktivite

Probiyotik bakteri seçim kriterlerinin en önemlilerinden biri de patojenlere ve bozulma etmeni mikroorganizmalara karşı gösterilen antimikrobiyel aktivitedir (Reid vd. 2001). Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel aktiviteleri; organik asitler (laktik, asetik, propionik asitler), karbon dioksit, hidrojen peroksit, diasetil, düşük molekül ağırlıklı antimikrobiyel maddeler ve bakteriyosinler gibi bazı maddeler tarafından oluşturulur (Ouweland ve Vesterlund 2004).

Bakteriyosinler, çoğunlukla üretici suşlara yakın türler ve Gram-pozitif bakteriler üzerinde bakteriyosidal ve bakteriyostatik etki gösteren, ribozomal olarak sentezlenerek ortama salgılanan protein yapıdaki antimikrobiyel bileşiklerdir (Klaenhammer 1993). Protein yapıdaki bu bileşikler; gıdalarda bozulma ve hastalık etmeni gıda kökenli

bakterilerin gelişmesini engelleyici özelliklerinden dolayı, gıda endüstrisi için büyük önem taşımaktadır. Bununla birlikte bakteriyosinler, antibiyotiklere alternatif olarak insan ve hayvan enfeksiyonlarının tedavisinde kullanım potansiyelleri ile de öne çıkmaktadırlar (Nes ve Tagg 1996, Akkoç 2008). Bakteriyosinler bazı kaynaklarda antibiyotikler ile karıştırılmaktadır. Fakat antibiyotikler ile aralarında belirgin farklılıklar vardır. Bunları dört grupta toplamak mümkündür;

1. Bakteriyosinler, ribozomal olarak sentezlenirken, antibiyotikler enzimatik işleme sonucu aktif formlarını kazanırlar (bu süreçlerde kotranslasyonel ve post-translasyonel modifikasyonlar etkilidir).
2. Bakteriyosinlerin etki spektrumu antibiyotiklere göre çok daha dardır.
3. Her bakteriyosinin kendi dirençlilik proteini vardır. Bu dirençlilik proteinlerini kodlayan genler, bakteriyosinlerin yapısal genleri ile bağlantılıdır. Antibiyotik dirençliliğini yöneten genetik determinantlar ise, yapısal antibiyotik genleri ile bağlantılı değildir.
4. Bakteriyosinler genellikle gelişme fazında üretilen birincil metabolitlerdir ve iki bileşenli bir sistem tarafından regüle edilir. Antibiyotikler ise, gelişimin durma fazında üretilen ikincil metabolitler olarak tanımlanmaktadır (Nes vd. 2001, Margaret vd. 2002).

Laktokokların ürettiği bakteriyosinler arasında en fazla bilinenleri; nisin başta olmak üzere, laktokoksin A, laktokoksin B, laktokoksin MN, laktokoksin G, laktokoksin 972, laktisin 481, laktisin 3147 ve son yıllarda tanımlanan laktisin FS92, laktisin RM, laktisin NK24, laktokoksin R, laktokoksin MMT24 ve laktokoksin MMFII'dir (Çizelge 2.3) (Lee ve Paik 2001, O'Sullivan vd. 2003a, Badis vd. 2004).

Çizelge 2.3 Laktokoklar tarafından üretilen bakteriyosinlere bazı örnekler (Fonseca vd. 2000)

Bakteriyosin	Üretici Suş	Antibikrobiyel Aktivite
Nisin	<i>Lactococcus lactis</i> 'in çeşitli suşları	<i>Lactococcus spp.</i> <i>Streptococcus spp.</i> <i>Micrococcus spp.</i> <i>Pediococcus spp.</i> <i>Lactobacillus spp.</i> <i>Listeria spp.</i> <i>Mycobacterium spp.</i> <i>Clostridium spp.</i> (+ spor) <i>Bacillus spp.</i> (+ spor)
Nisin A		
Nisin Z		
Laktokoksin A	<i>L. lactis</i>	Laktokoklar üzerinde çok dar etkiye sahip
Laktokoksin G	<i>L. lactis</i> LMG2081	Laktik asit bakterileri <i>Clostridium spp.</i>
Laktokoksin 972	<i>L. lactis</i> IPLA972	<i>Lactococcus spp.</i>
Laktisin 481	<i>L. lactis</i> CNRZ 481, ADRIA85LO30	Laktik asit bakterileri ve <i>Clostridium tyrobutyricum</i>
Laktisin 3147	<i>L. lactis</i> DPC3147	<i>Enterococcus spp.</i> <i>Lactococcus spp.</i> <i>Streptococcus spp.</i> <i>Pediococcus spp.</i> <i>Lactobacillus spp.</i> <i>Clostridium spp.</i> <i>Leuconostoc spp.</i> <i>Staphylococcus aureus</i>

Laktokoklar tarafından üretilen tanımlanmış birçok bakteriyosin olmasına rağmen, *L. lactis* subsp. *lactis* suşları tarafından üretilen nisin, gıdalarda ticari kullanım olanağı bulan tek bakteriyosindir (Noonpakdee vd. 2003, Hindre vd. 2003). *L. lactis* ve *S. uberis*'in bazı suşları tarafından üretilen nisin, post-translasyonel modifikasyonlarla aktif formu oluşturulan polipeptit yapısında bir bakteriyosindir (Klaenhammer 1988, Hansen 1994). İnhibisyon etkinliği ve memeli sindirim sistemi tarafından inaktive edilme özellikleri esas alınarak, 1969 yılında Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya

Sağlık Örgütü (WHO) tarafından gıda koruyucusu olarak kabul edilmiştir (WHO 1969). Böylece nisin, Avrupa Birliği ve ABD'yi de kapsayan 50'den fazla ülkede süt ve süt ürünleri, konserve ve hazır çorbalar gibi değişik gıdaların korunması amacı ile kullanılmaya başlanmıştır (Delves-Broughton 1990). Türkiye'de kullanımına izin verilen nisin kimyasal formülü $C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$ olup, Gıda Kodeksinde E234 olarak simgelenmiştir (Delves-Broughton 2005).

Diğer bakteriyosinlere kıyasla etki spektrumu daha geniş olan nisin asidik gıdalarda yüksek düzeyde aktivite göstermektedir (Liu ve Hansen 1990). *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria* ve *Mycobacterium* cinslerine ait türler yanında *Bacillus* ve *Clostridium* gibi spor oluşturan bakterilere karşı da gıda sistemlerinin korunması amacı ile kullanılmaktadır (Klaenhammer 1988, Cleveland vd. 2001).

2.2.3 Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığı üzerine etkileri

2.2.3.1 Diyare üzerine etkileri

Diyare; *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Clostridium difficile* ve rotavirüs enfeksiyonları sonucu bağırsakta peristaltik hareketlerin artması ve emilimin azalması veya salgılanmanın artması sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır (Ciarlet ve Estes 2001).

Çocuklarda rotavirüsün neden olduğu akut diyareden korunmak ya da tedavisi için probiyotiklerin yararlı etkileriyle ilgili güçlü bilgiler *Lactobacillus rhamnosus* GG ve *Bifidobacterium lactis* BB-12 den elde edilmiştir (FAO-WHO 2001). Rotavirüs ile enfekte olmuş çocuklarda, probiyotik tedavi diyare süresini kısaltmakta ve sıvı dışkılamada azalmaya neden olmaktadır (Guandalini vd. 2000, Szajewska vd. 2001).

Antibiyotikler, *C. difficile* gibi patojenik mikroorganizmaların gelişimini destekleyerek ve doğal floranın kolonizasyon direncini kırarak bağırsak mikroflorasını doğrudan etkilerler. Kontrollü yapılan çalışmalar, probiyotiklerin diyareye neden olan *C. difficile*'de belirgin oranda azaltıcı etkisi olduğu gösterilmiştir (Parracho vd. 2007).

Radyoterapi tedavisi gören kanser hastalarında ve enteral tüple beslenen hastalarda görülen başlıca akut diyarede ve seyahet diyaresinde de probiyotik preperatların akut diyarenin şiddetini önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır (Sullivan ve Nord 2005).

2.2.3.2 Laktoz intölerans üzerine etkileri

Laktoz intölerans olarak adlandırılan bireylerde, genetik yapılarındaki bozukluk nedeniyle β -galaktozidaz enzimi üretilmemekte, dolayısıyla laktoz metabolize edilememektedir. Bu kişiler süt ve laktoz içeren gıdaları tükettiklerinde; sindirim bozuklukları, diyare, karın ağrısı, kramplar ve gaz oluşumu ortaya çıkmaktadır. Eğer laktoz ince bağırsaktan emilmeden geçerse, kalın bağırsaktaki bakteriler tarafından gaz ve asite dönüştürülmekte ve sonuçta bağırsak şişkinliği oluşmaktadır (Fooks vd. 1999).

Probiyotiklerin laktoz intölerans üzerine yararlı etkileri iki şekilde açıklanmaktadır. Birincisi, fermente gıdalarda yüksek lakkaz aktivitesine sahip bakterilerin kullanılması sonucu laktoz konsantrasyonunun düşmesi, diğeri ise fermente gıdalar veya canlı probiyotik bakteriler sayesinde ince bağırsakta lakkaz aktivitesinin artırılmasıdır (Salminen vd. 2004). Bifidobakteriler ve diğeri probiyotik bakterilerin klinik preperasyonlarının, laktoz intöleranslı hastalara uzun süre verilmesiyle hastalarda semptomların azaldığı veya tamamen ortadan kalktığı gösterilmiştir (Heyman ve Menard 2002).

2.2.3.3 Bağışıklık sistemi üzerine etkileri

Bağırsaklara tutunabilen probiyotik suşlarının geçici olarak sindirim kanalında kolonize olabildiği bilinmektedir. Bu geçici kolonizasyon; γ interferon üretiminde, IgA seviyelerinde ve periferik kan granülositlerinin fagositik aktivitelerinde artışa neden olmaktadır (Collins vd. 1998). İki ayrı denemede *L. johnsonii* LJ-1 ve *L. salivarius* UCC 118 mukozal IgA cevabını stimüle etmiş ve fagositik aktiviteyi arttırmıştır (Saarela vd. 2000). Bağışıklık sisteminin uyarılmasıyla serumda IgA gibi antikorların artması virüslere, *Clostridium* ve *E. coli* gibi patojenlere karşı vücudun dirençliliğini artırmaktadır (Mitsuoka 1990, Collins vd. 1998).

L. rhamnosus GG ve *B. lactis* Bb-12 ‘dan elde edilmiş ekstraktların in- vitro koşullarda lenfosit çoğalmasını baskıladığı gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, *L. rhamnosus* GG’nin Crohn hastalığına yakalanmış bireylerde IgA immun cevabını arttırdığı ve rotavirüsden dolayı diyareye yakalanan çocuklarda antikor salgıyan hücre cevabını arttırdığı gözlenmiştir (Saarela vd. 2000).

2.2.3.4 Kolesterol düşürücü etkileri

Birçok araştırmacı laktik kültür içeren süt ürünleri ve probiyotiklerin kolesterol düşürücü etkileri olduğunu bildirmiştir (Taylor ve Williams 1998, Rolfe 2000). Probiyotik bakterilerin serum kolesterolünü düşürücü etkileri ve mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Bununla ilgili çeşitli hipotezler öne sürülmüştür;

- *L. acidophilus*’un bazı suşlarının kolesterolü asimile ettikleri öngörülmektedir (Rasic vd. 1992).
- Probiyotik laktobasillerin ve bifidobakterlerin safra tuzlarını serbest asitlere parçalayarak, konjuge safra tuzlarının intestinal sistemden daha hızlı uzaklaştırılmasını sağladıkları varsayılmaktadır. Serbest safra tuzları vücuttan atıldığı için, kolesterolden yeni safra asitlerinin sentezi, vücuttaki toplam kolesterol konsantrasyonunu düşürebilmektedir (Laurens- Hattingh ve Viljoen 2001).
- Probiyotik laktik asit bakterilerinin asit üretimi sonucu düşen pH değerlerinin dekonjuge safra tuzları ile kolesterolün presipitasyonuna neden olduğu öngörülmektedir (De Boever vd. 2000).

Rossi vd. (1999) yaptıkları çalışmada *E. faecium*, *L. acidophilus*, *L. jugurti*, *S. salivarius* subsp. *thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*’un in-vitro koşullarda kolesterol konsantrasyonunu azaltma ve safra tuzları varlığında gelişebilme yeteneklerini araştırmış ve araştırma sonunda *E. faecium* ile *L. jugurti* (1:1 oranında) kombinasyonu kullanılarak yapılan fermente ürünün kolesterolü % 43 oranında düşürdüğü tespit edilmiştir.

2.2.3.5 Antikarsinojenik etkileri

Probiyotiklerin kanser oluşumu riskini azalttığı ise birçok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur. Örneğin Aso ve Akazan (1992), çalışmalarında 10^{10} kob/g düzeyinde *L. casei* toz preparatından bir yıl boyunca günde üç defa tüketen insanlarda mesane kanseri tedavi sürecinin hızlandırıldığını tespit etmişlerdir.

Antitümör aktivitesi kesin olarak bilinmemesine rağmen McIntosh probiyotiklerin antikarsinojenik etkisi ile ilgili bazı önermeler ileri sürmüştür (Fooks vd. 1999). Bunlar;

- Gastrointestinal sistemde bulunan diğer bakteriler tarafından üretilen prokarsinojenleri karsinojenlere çeviren enzimlerin yapısını değiştirmek,
- Bağırsak pH'sını değiştirerek mikroflora aktivitesini ve safra çözünürlüğünü etkilemek,
- Çok etkili fekal mutajenleri uzaklaştırmak için kolondan geçiş süresini değiştirmek,
- İmmün sistemi uyarmak, olarak tanımlanmıştır.

Bunların yanı sıra probiyotik bakterilerin klinik olarak birçok etkisi olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2.4) (Sanders ve Veld 1999) .

Çizelge 2.4 Yaygın olarak kullanılan probiyotik bakteriler ve klinik çalışmalarla belirlenen etkileri (Sanders ve Veld 1999)

Suş	Klinik Çalışmalarla Belirlenen Etkiler
<i>Lactobacillus johnsonii</i> LA1	İnsan bağırsak hücrelerine tutunma, bağırsak florasının düzenlenmesi, bağırsıklığın düzenlenmesi, <i>H. pylori</i> tedavisinde yardımcı ajan
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFB 1748	Fekal enzim aktivitesinin azaltılması, radyoterapi nedenli diyarenin önlenmesi, kabızlığın iyileştirilmesi
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC 53013)	Rotavirus diyare riskinin azaltılması ve tedavisi, antibiyotik nedenli diyarelere karşı koruma, bebeklerdeki atopik ekzamanın azaltılması, atopik hastalıkların önlenmesi, sistik fibrozis semptomlarının azaltılması, bifidobakteri florasının desteklenmesi, <i>Streptococcus mutans</i> aktivitesinin azaltılması
<i>Str. thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Laktoz intoleransı semptomlarında suşa bağlı iyileştirme
<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5	İntestinal floranın düzenlenmesi, seyahat diyarelerine karşı koruma, immün modülasyon
<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12	Rotavirüs diyarelerini de içeren viral diyarelerin tedavisi
<i>Lactobacillus gasseri</i> (ADH)	Fekal enzim aktivitesinin azaltılması
<i>Lactobacillus reuteri</i>	İntestinal sisteme kolonizasyon, rotavirüs diyarelerinin tedavisi, intestinal floranın düzenlenmesi
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	İmmün modülasyon, intestinal floranın düzenlenmesi
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> DR 10	İmmün modülasyon, intestinal floranın düzenlenmesi, mukozaya tutunma
<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019	İmmün modülasyon, intestinal floranın düzenlenmesi

Çizelge 2.4 Yaygın olarak kullanılan probiyotik bakteriler ve klinik çalışmalarla belirlenen etkileri (devam) (Sanders ve Veld 1999)

Suş	Klinik Çalışmalarla Belirlenen Etkiler
Probiyotik karışım VSL 3	İnflamatöz bağırsak hastalıklarında ve rahatsız bağırsak sendromunda pozitif etki, poşitisin önlenmesi, radyoterapi nedenli diyaların önlenmesi ve tedavisi
<i>Escherichia coli</i> NISSLE	İnflamatöz bağırsak hastalıklarında pozitif etki
<i>S. boulardii</i>	Antibiyotik nedenli diyarelerin önlenmesi, <i>C. difficile</i> kolitlerinin tedavisi, antibiyotik nedenli diyarelerin tedavisi
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	İntestinal düzensizliklerin önlenmesi, intestinal bakterilerin düzenlenmesi, fekal enzim aktivitesinin azaltılması, mesane kanserinin tekrarlanması engellenmesi, mesane kanseri riskinin azaltılması
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NFCM	Fekal enzim aktivitesinin azaltılması, yüksek laktaz aktivitesi, laktoz intoleransı tedavisi, bakteriyosin üretimi

2.2.4 Probiyotiklerin etki mekanizmaları

Probiyotiklerin etki mekanizmasına yönelik çalışmalar, bağırsak florasının düzensizliğiyle ortaya çıkan gastrointestinal sistemdeki bozukluklara dayanılarak gerçekleştirilmektedir. Probiyotiklerin konakçıyı bağırsak sistemi bozukluklarına karşı nasıl koruduğunu açıklamaya çalışan birçok mekanizma bulunmaktadır. Probiyotiklerin muhtemel etki mekanizmaları aşağıda özetlenmiştir (Salminen vd. 1998).

a) İnhibe edici maddeler üretme: Probiyotikler, Gram-pozitif ve Gram-negatif mikroorganizmalar üzerinde etkili birçok madde üretmektedir. Bunlardan bazıları organik asitler, hidrojen peroksit, bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddelerdir (Rolfe 2002, Parracho vd. 2007).

- b) Tutunma bölgelerini bloke etme: Probiyotikler tutunma bölgeleri için patojenlerle yarışmaya girerek, patojenlerin intestinal sistemde yerleşmelerini engellemektedirler (Fooks ve Gibson 2002, Parracho vd. 2007).
- c) Besin maddeleri için rekabet: Probiyotikler patojenler için de gerekli olan besin maddelerini tüketmek suretiyle onların sistemde uzun süre kalmasını engellemektedirler.
- d) Toksin reseptörlerinin yıkımı: Bu mekanizma hayvanlarda *S. bouardii*' nin intestinal mukozada bulunan *C. difficile*' nin toksin reseptörlerini parçalayarak konakçıyı koruması sonucunda ortaya çıkmıştır.
- e) Bağışıklık sistemini destekleme: Son yıllarda yapılan çalışmalar probiyotiklerin spesifik ve spesifik olmayan bağışıklık sistemini güçlendirerek intestinal hastalıklara karşı konakçıyı koruduğunu ortaya koymuştur. Bu mekanizma tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen spesifik hücre duvarı bileşenlerinin veya hücre yüzeylerinin adjuvant etki gösterdiği ve humoral immun yanıtı güçlendirdiği düşünülmektedir (Fukushima vd. 1998).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteriler

Bu çalışmada, Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan inek sütlerinden izole edilmiş olan *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL27 suşu ve Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilen *L. lactis* SIK83, *L. lactis* IL1403, *L. lactis* 105, *L. lactis* JC17, *Lactobacillus sake* NCDO2714, *Pediococcus pentosaceus* FBB611, *Pediococcus pentosus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* NCDO581, *E. faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aureginosa* DSMZ50071, *Pseudomonas fluorescens* P1, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus cornosus* MC1.B, *Salmonella enteridis* ATCC 13075, *Salmonella enterica* serotype Typhimurium SL1344, *Streptococcus agalactiae* DSMZ6784, *Micrococcus luteus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* DSMZ31, *B. cereus* ATCC 11776, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 indikatör bakteriler kullanılmıştır.

Bakteriler; glukoz M17B (GM17B, %5 glukoz), LB, MRSB ve TSYB ortamlarına % 20 oranında steril gliserol ilave edilerek, -80 °C'de saklanmıştır (Todorov vd. 1999). Çalışma materyalleri, gliserol ilave edilmemiş TSYB, LB, MRSB ve glukoz M17B ortamlarında ve haftalık transferler yapılarak korunmuştur.

3.2 Yöntem

3.2.1 *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun antimikrobiyel aktivitesi

Antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğu bilinen *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun nisin bakteriyosini üretim özelliğinin kuyu difüzyon yöntemi ile belirlenmesi için 30 °C'de 18 saat glukoz M17 sıvı besi ortamında geliştirilen kültür, 6000 rpm'de 15 dakika süreyle oda sıcaklığında santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Üst sıvı, çöken katı

fazın karışmamasına dikkat edilerek yeni tüplere aktarılmış ve ayrılan üst faz 0.45 µm por çaplı membran filtreden (Millex-Millipore) geçirilerek sterilize edilmiştir. MRS, LB, TSYB ve GM17 sıvı ortamlarında geliştirilen indikatör bakteriler, 5 mL yarı katı agar (MRS, LB, TSYB ve GM17) ortamlarına inoküle edilerek, her biri için ayrı ayrı uygun agar plaklarının üzerine ikinci bir tabaka halinde, homojen şekilde yayılmıştır. Agar plakları üzerinde steril bir şekilde 6 mm çapında kuyucuklar açılarak suşun nisin bakteriyosini içeren üst sıvısı kuyucuklara 100 µL aktarılmış ve ortamlar uygun sıcaklıklarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kuyucukların etrafında inhibisyon zonu oluşumu incelenerek sonuçlar değerlendirilmiştir (Tagg ve McGiven 1971).

L. lactis subsp. *lactis* LL27 suşu ve indikatör bakteriler için kullanılan sıvı besiyerlerine % 1.5 Agar-agar ilave edilerek katı besiyeri, % 0.5 Agar-agar ilave edilerek yarı katı besiyeri elde edilmiştir.

GM17 Broth		
Poliipepton	5	g
Fitopepton	5	g
Maya ekstraktı	2.5	g
Et ekstraktı	5	g
Laktoz monohidrat	5	g
Askorbik asit	0.5	g
B-gliserofosfat	19	g
Magnezyum sülfat	0.25	g
Destile su	1000	mL

Sterilizasyondan önce pH 7.2±0.2'ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir.

MRS Broth		
Kazein peptonu	10	g
Et ekstraktı	8	g
Maya ekstraktı	4	g
D-glukoz	20	g
Dipotasyum hidrojen fosfat	2	g
Tween 80	1	g
Diamonyum hidrojen sitrat	2	g
Sodyum asetat	5	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2	g
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.04	g
Destile su	1000	mL

Sterilizasyondan önce pH 5.7±0.2'ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir.

Lauria Bertani Broth		
Trypton	10	g
Maya ekstraktı	5	g
NaCl	10	g
Destile su	1000	mL

Sterilizasyondan önce pH 7.0±0.2'ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir.

TSYB		
Kazein peptonu	17	g
Fitopepton	3	g
D-glukoz	2.5	g
NaCl	5	g
Dipotasyum hidrojen fosfat	2.5	g
Maya ekstraktı	6	g
Destile su	1000	mL

Sterilizasyondan önce pH 7.3±0.2'ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir.

3.2.2 *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun antibiyotik duyarlılık düzeyinin belirlenmesi

Antibiyotik duyarlılık düzeyinin belirlenmesinde Bauer vd. (1966) tarafından önerilen disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşu 30 °C’de 18 saat geliştirildikten sonra, hücre yoğunluğu 1×10^6 kob/mL ($A_{600}=0.08-0.1$) düzeyinde ayarlanarak 10 mL’lik GM17 sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. Suşun gelişmesi için uygun olan GM17 agar içeren petri plakları ve 5 mL lik tüplerde yarı katı GM17 hazırlanmıştır. GM17 besiyerleri eritildikten sonra bakteri inokülasyonu için uygun sıcaklığa getirilmiş ve her tüpe 1×10^6 kob/mL hücre yoğunluğu düzeyinde geliştirilmiş aktif kültürlerden 100’er µL inoküle edilmiştir. Homojen hale gelinceye kadar karıştırıldıktan sonra, bakteri içeren yarı katı besiyerleri GM17 agar plakları üzerine ikinci bir tabaka oluşturacak şekilde yayılmıştır. Yarı katı besiyerleri katılaştıktan sonra her plağa 5 adet antibiyotik diski yerleştirilmiş ve 30 °C’de 18-24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda antibiyotik disklerinin etrafında oluşan zonların çapları ölçülmek suretiyle antibiyotik duyarlılık/dirençlilik düzeyleri belirlenmiştir.

Antibiyotik disk difüzyon çalışması sonucunda, LL27 suşu zon gözlenmeyen antibiyotiklere karşı dirençli kabul edilerek Clinical Laboratory Standarts Institute Protocol M27-A’ya göre minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerleri hesaplanmıştır. Antibiyotiklerin toz formları kullanılarak her antibiyotik için artan konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu plaka kullanılarak yapılan bu çalışmada öncelikle her bir kuyucuğa 100 µL Müller Hinton Broth transfer edilmiştir. 96 kuyucuklu plaklardaki her bir sıranın ilk kuyucuğuna hazırlanan antibiyotik çözeltilerinden 100’er µL ilave edilmiş ve bir sonraki kuyuya dilüsyon uygulanarak her kuyuda farklı antibiyotik konsantrasyonunun oluşması sağlanmıştır. Son olarak da 18 saatlik aktif bakteri kültüründen her kuyucuğu 10 µL inoküle edilmiş ve 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda kuyucuklar kontrol edilerek üremenin meydana gelmediği ilk konsantrasyon MİK değeri olarak belirlenmiştir.

Müller Hinton Broth		
Et infüzyonu	2	g
Kazein hidrolizat	17.5	g
Nişasta	1.5	g
Destile su	1000	mL

Sterilizasyondan önce pH 7.4±0.2'ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir.

3.2.3 *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun düşük pH, pepsin, pankreatin ve safra tuzlarına karşı direncinin belirlenmesi

Suşun probiyotik özelliklerinin belirlenmesi için ilk olarak düşük pH değerlerine toleransı araştırılmıştır. 18 saatlik aktif kültürden 1'er mL alınmış ve 3000 g'de 5 dakika (4 °C) santrifüj edilerek hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. Çöktürme işleniminin ardından tamponlanmış fosfat çözeltisi PBS (pH 7.2) ile iki kere yıkama işlemi yapılmıştır. LL27 suşunun asit toleransının araştırılmasında pH 2.0 ve 3.0 düzeyine ayarlanmış iki farklı PBS'nin yanı sıra pH değeri 7.2'ye ayarlanan PBS'de kontrol olarak kullanılmıştır. Kontrol ve test grupları, pH 7.2'ye ayarlanan PBS ile iki kez yıkandıktan sonra üzerlerine pH 2, pH 3 ve pH 7.2'ye ayarlanan PBS'ler ilave edilmiş ve 30 °C'de 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyonun 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4. saatlerinde her bir deneme grubundan örnekler alınmış ve 10⁻⁷ düzeyine kadar seyreltildikten sonra GM17 agar ortamlarına paralelli yayma ekim yapılmıştır. 30 °C'de 18-24 saat inkübasyonun ardından kontrol ve test gruplarındaki koloniler sayılıp, log (kob/mL) olarak değerleri kaydedilmiş ve % canlılık oranları hesaplanmıştır (Conway vd. 1987).

$$\% \text{ Canlılık} = (X / X_o) \times 100$$

X_o: Kontrol grubu canlı mikroorganizma sayısı

X : Test grubu canlı mikroorganizma sayısı

Suşun pepsine toleransının araştırılmasında, gastrik koşulunun oluşturulması amacıyla pH 2.0 ve pH 3.0 düzeyleriyle çalışılmıştır. Bu doğrultuda, 1 mL'lik aktif bakteri kültürü 5000 g'de 5 dakika (4 °C) santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüştür. LL27 suşunun pepsin direncinin araştırılmasında pH 2 ve pH 3 ortamlarının yanı sıra pH 7.2 kontrol grubu olarak çalışılmıştır. Test gruplarına, pepsin (3 mg/mL; Merck) içeren PBS çözeltisi (pH 2 ve pH 3) ilave edilerek 30 °C'de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyonun 0, 1 ve 3. saatlerinde kontrol ve test gruplarından alınan örnekler 10⁻¹⁰ düzeyine kadar seyreltmenin ardından GM17 agar ortamlarına yayma ekimler yapılmıştır. 30 °C'de 18-24 saat inkübasyondan sonra kontrol ve test gruplarındaki koloniler sayılmış, log (kob/mL) olarak değerleri kaydedilmiş ve % canlılık oranları hesaplanmıştır (Charteris vd. 1998).

Pankreatin ve safra tuzlarına karşı LL27 suşunun direnç özelliğinin belirlenmesi için, 1 mL'lik 18 saatlik aktif kültürler 5000 g'de 5 dakika (4 °C) santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüştür. Pankreatin testi için hazırlanan hücreler, PBS ile (pH 7.2) iki kez yıkandıktan sonra, test grubuna pankreatin içeren (1 mg/mL, Fluka) PBS tamponu (pH 8.0) ilave edilmiş 30 °C'de 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Safra tuzuna toleransı test etmek için hazırlanan hücrelere ise, % 0.3 (w/v) safra tuzuyla zenginleştirilmiş GM17 sıvı besiyeri ilave edildikten sonra 30 °C'de 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyonun 0 ve 4. saatlerinde kontrol ve test gruplarından örnekler alınarak 10⁻¹⁰ düzeyine kadar seyreltilmiş ve GM17 agar ortamlarına yayma ekimler yapılmıştır. 30 °C'de 18-24 saat inkübasyon sonrası kontrol ve test gruplarındaki koloniler sayılıp log (kob/mL) olarak değerleri hesaplanmıştır (Charteris vd. 1998).

PBS		
NaCl	8	g
KCl	0.2	g
Na ₂ HPO ₄	1.44	g
K ₂ HPO ₄	0.24	g
Destile su	1000	mL

Çözelti istenilen pH düzeylerine ayarlandıktan sonra 121 °C'de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir.

3.2.4 *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun Caco-2 ve CCL-221 hücrelerine tutunması

L. lactis subsp. *lactis* LL27 suşunun Caco-2 ve CCL-221 hücrelerine tutunma denemeleri iki farklı yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Maragkoudakis vd. (2006)'nin önerdiği yöntemle göre Caco-2 hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen tutunma denemeleri Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarlarında yapılmıştır. Kullanılan Caco-2 hücreleri; % 10 inaktive edilmiş serum (v/v), % 1 esansiyel olmayan aminoasit, % 1 L-glutamin, 20 µg/mL streptomisin ve penisilin ilave edilmiş DMEM (GIBCO) ortamında 37 °C'de % 5 CO₂ varlığında inkübe edilerek geliştirilmiştir. Tutunma denemeleri için geliştirilen Caco-2 hücreleri, 24 kuyulu doku kültür plakalarına 1.2x10⁵ hücre/kuyu olacak şekilde inoküle edilmiş ve besiyeri her gün değiştirilmek suretiyle 15 gün süresince inkübe edilmiştir.

GM17 sıvı ortamında geliştirilen *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 ve LB sıvı ortamında geliştirilen kontrol suşları *S. Typhimurium* SL1344 ve *E. coli* ETEC'e, 6000 rpm'de 15 dakika (4 °C) santrifüj uygulanarak hücreler çöktürülmüştür. Kültür üst sıvısı uzaklaştırıldıktan sonra hücreler PBS (pH 7.2) ile iki kez yıkanmış ve aynı tamponda çözülmüştür. Hücre konsantrasyonu Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM (GIBCO) ile 10⁸ kob/mL düzeyine ayarlanarak steril tüplere alınmıştır. Caco-2 hücrelerinin bulunduğu kuyulardaki besiyeri ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler PBS ile 3 kez yıkanmıştır. Bakteri-DMEM süspansiyonundan kuyulara 1'er mL aktarıldıktan hemen sonra plakalar 37 °C'de % 5 CO₂'de 90 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda tutunmamış bakteri hücrelerini ortamdan uzaklaştırmak amacıyla, kuyulardaki sıvı ortam steril pipet yardımıyla alınmış ve kuyulardaki Caco-2 hücreleri 2 kez PBS tamponuyla yıkanmıştır. Caco-2 hücrelerine tutunmuş bakterileri kuyulardan alabilmek amacı ile her bir kuyuya 1 mL Tween 80 (% 0.1) aktararak 30 dakika inkübasyona tabi tutulmuştur. Bakteri süspansiyonu steril mikrosantrifüj tüplerine alındıktan sonra 10⁻⁷ düzeyine kadar dilüsyonları hazırlanmış, GM17 ve LB agar plaklarına yayma ekimler yapılmıştır. 37 °C'de 18-24 saat inkübasyon sonrasında petri plaklarındaki koloniler sayılarak canlı hücre sayısı belirlenmiştir. Bu deneme hata payının mümkün olduğunca azaltılması amacıyla 6 defa

tekrarlanmıştır. Kontrol suşlarının ve *L. lactis* subsp. *lactis* LL27'nin Caco-2 hücrelerine tutunma yetenekleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Maragkoudakis vd. 2006).

$$\text{Bakteri Tutunma Oranı (BTO)} = \frac{TBS}{BBS} \times 100$$

TBS: 90 dakika sonunda tutunmuş bakteri sayısı

BBS: Başlangıç bakteri sayısı

Bir diğer tutunma denemesinde ise, Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden elde edilen orijinal insan kolon kanseri hücreleri olan Caco-2 hücreleri ve GATA Kanser Araştırma Merkezinden elde edilen CCL-221 hücreleri kullanılmıştır. Caco-2 hücreleri % 10 inaktive edilmiş serum (v/v), % 1 esansiyel olmayan aminoasit, % 0.1 lenfosit indüksiyon faktörü ilave edilmiş DMEM (Invitrogen) ortamında, kolorektal CCL-221 hücreleri ise % 10 inaktive edilmiş serum (v/v) ve % 1 esansiyel olmayan aminoasit RPMI (Invitrogen) ortamında 37 °C'de % 5 CO₂'de inkübe edilerek geliştirilmiştir. Çalışmada kullanılacak hücre kültürleri, 4x10⁵ hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyulu hücre kültürü plakları içine yerleştirilmiş ince cam yüzeyler üzerine inoküle edilmiş ve besiortamları 3 günde bir değiştirilmiştir. 2 haftalık inkübasyon sonrasında hücre kültürleri bölmeli lamlara aktarılmış ve besi ortamları 3 günde bir değiştirilerek 14 gün % 5 CO₂'de inkübe edilmiştir.

GM17 sıvı ortamında 20 saat geliştirilen *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 10.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek, hücreler çöktürülmüştür. Kültür üst sıvısı uzaklaştırıldıktan sonra hücreler PBS (pH 7.2) ile iki kez yıkanmış ve aynı tamponda çözülerek hücre konsantrasyonu 10⁹ kob/mL düzeyine ayarlanmıştır. 14 günlük inkübasyon süresinin tamamlanmasının ardından lamlar PBS tampon ile 2 kez yıkanmış ve bakteri süspansiyonları (10⁹ kob/mL), Caco-2 ve CCL-221 hücreleri bulan lamların her bölmesine inoküle edilmiştir. Lamlar 37 °C'de % 5 CO₂'de 60 dakika inkübasyon basamağını takiben iki defa PBS ile yıkanmış ve May Grünwald solüsyonu ile fiksasyon edilmiştir. Fiksasyon sonrasında Giemsa boyası ile boyanan lamlar mikroskop altında

incelenmiştir. Caco-2 ve CCL-221 hücrelerine tutunan bakteri sayısı; lam üzerinde 5 farklı bölgeden rastgele seçilen 20 mikroskop alanının taranması ve elde edilen sonuçların ortalamalarının alınmasıyla hesaplanmıştır. Bu deneme iki tekrarlı ve üç palalelli olarak çalışılmıştır (Morita vd. 1992).

L. lactis subsp. *lactis* LL27 suşunun Caco-2 ve CLL-221 hücrelerine tutunmasının görüntülemesi işlemleri Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Elektron Mikroskobu Biriminde yer alan tarama elektron mikroskobisi (SEM) kullanılarak yapılmıştır. Caco-2 ve CLL-221 hücreleri 1 saat LL27 suşu ile muamele edildikten sonra, hücreler 0.1 M fosfat tamponu (pH 7.2) ile hazırlanmış % 2.5'lik gluteraldehit ile 4 °C'de fiske edilmiştir. Fosfat tamponu ile 2-3 kez yıkandıktan sonra PBS'de (pH 7.2) hazırlanmış % 1'lik osmiyum tetraoksit ile tekrar fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnekler % 70, % 80, % 90 ve % 100 konsantrasyonundaki alkoller ile muamele edilerek dehidrasyonları sağlanmış ve son aşamada fosfat tamponu ile yıkanmıştır. Amilasetata transfer edilen örnekler, CO₂ kullanılarak kurutulmuş ve altınla kaplanmıştır. Hazırlanan preparatlar Jeol JSM 6060 LV taramalı elektron mikroskobunda 5-10 kv ivmelenme voltajında incelenmiştir.

3.2.5 *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun patojen bakterilerin Caco-2 hücrelerine tutunmalarını engellemesi

Caco-2 hücrelerine patojen mikroorganizmaların tutunmalarının engellenmesi denemelerinde *S. Typhimurium* SL1344 ve *E. coli* ETEC suşları kullanılmıştır.

18 saatlik aktif kültürler 6000 rpm'de 15 dakika (4 °C) santrifüj edilerek hücrelerin çöktürülmesi sağlanmıştır. Kültür üst sıvısı uzaklaştırıldıktan sonra hücreler iki kez PBS tamponu (pH 7.2) içinde yıkanmış ve hücre konsantrasyonu DMEM ile 10⁸ kob/mL'ye ayarlanarak steril tüplere alınmıştır. Caco-2 hücrelerine, *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun tutunması çalışmaları daha önce belirtilen (Bölüm 3.2.4) yöntemle göre gerçekleştirilmiş ve 90 dakikalık inkübasyonu takiben kuyulardaki Caco-2 hücreleri 3 kez PBS tamponuyla yıkanmıştır. Kuyulara *S. Typhimurium* SL1344 ve *E. coli* ETEC DMEM süspansiyonundan 1 mL aktarılmış ve kültür plakları 37 °C'de % 5 CO₂'de 90 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresinin ardından kuyulardaki sıvı faz

uzaklaştırılmış ve Caco-2 hücrelerine tutunmuş bakteri hücreleri 1 mL Tween 80 (% 0.1) muamelesi ile geri kazanılmıştır. 10^{-7} düzeyine kadar hazırlanan dilüsyonlardan Mc Conkey Agara yayma ekimler yapılmış ve uygun sıcaklıklarda 18-24 saat inkübasyon sonrası petri plaklarındaki koloniler sayılarak tutunmuş patojen bakteri sayısı (TPBS) belirlenmiştir. Daha sonra inhibisyon oranı; tutunmuş patojen bakteri sayısı ile kuyulara yalnızca patojen bakteri muamelesi sonucu belirlenen tutunan patojen bakteri sayısı (BPBS) oranlanarak hesaplanmıştır. Patojen bakteri örneklerinin inhibisyon denemesi, 6 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir (Maragkoudakis vd. 2006).

$$\text{İnhibisyon Oranı (İO)} = 100 - \frac{TPBS}{BPBS} \times 100$$

Mc Conkey Agar		
Pepton	20	g
Laktoz	10	g
NaCl	5	g
Agar	13.5	g
Nötral red	0.03	g
Kristal viyole	1	mg
Safra tuzu	5	g
Destile su	1000	mL

Sterilizasyondan önce pH 7.2 ± 0.2 'ye ayarlanmış ve 121 °C'de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir.

3.2.6 Hidrofobisite

GM17 sıvı ortamında 18 saat 30 °C'de inkübe edilmiş kültür 10000 g'de 5 dakika süresince santrifüj edilmiştir. Çökmesi sağlanan hücrelerin üzerinden sıvı faz uzaklaştırılmış ve hücreler 50 mM K_2HPO_4 (pH 6.5) tampon çözeltisi ile iki kez yıkanmış ve yine aynı tampon çözeltisinde çözümleri sağlanmıştır. Hücre süspansiyonunun optik yoğunluğu 560 nm'de, yaklaşık 1.0 olacak şekilde aynı tampon çözelti kullanılarak ayarlanmıştır. OD:1 olan hücre süspansiyonundan 3 mL alınarak

üzerine 0.6 mL n-hekzadekan eklenmiş, 120 saniye boyunca karıştırılmıştır. Faz ayrımı için 5-10 dk beklendikten sonra ayrılan fazlardan sulu faz dikkatlice alınarak, spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda optik yoğunluğu ölçülmüştür. Sulu fazdaki optik yoğunluktaki düşüş dikkate alınmak suretiyle % hidrofobisite değeri hesaplanmıştır (Vinderola ve Reinheimer 2003).

$$\% \text{ Hidrofobisite} = [(A_0 - A) / A_0] \times 100$$

A₀: Kültürün ilk OD değeri

A: n-Hekzadekan uygulanmış örneğin OD değeri

3.2.7 *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun antioksidan etkisi

GM17 sıvı ortamında, 30 °C’de 20 saat geliştirilen bakteri kültürü 10000 rpm’de 5 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj sırasında çöken hücreler PBS kullanılarak iki kez yıkandıktan sonra yine aynı tampon kullanılarak çözülmüş ve bakteri hücre yoğunluğu 10⁹ kob/mL düzeyine ayarlanmıştır.

L. lactis subsp. *lactis* LL27 suşunun α, α- difenil-β-pikril hidrazil (DPPH)’i süpürme kapasitesinin belirlenmesi için 1 mL 10⁹ kob/ mL yoğunluktaki hücre süspansiyonu ile 1 mL yeni hazırlanmış DPPH çözeltisi (metanolde 0.1 mM) karıştırılmış ve 30 dakika süresince reaksiyonun oluşması için bekletilmiştir. DPPH süpürme kapasitesi 517 nm dalga boyunda yapılan ölçüm sonucu optik yoğunluktaki azalma belirlenmek suretiyle hesaplanmıştır (Blois 1958, Lin ve Chang 2000)

$$\% \text{ DPPH süpürme kapasitesi} = 1 - \frac{OD2}{OD1} \times 100$$

OD2: örnek optik yoğunluğu

OD1: kör (PBS) optik yoğunluğu

L. lactis subsp. *lactis* LL27 suşunun demir iyonu şelatlama aktivitesini belirlemek için 1 mL 10⁹ kob/ mL yoğunluktaki hücre süspansiyonu ile 2 mM FeCl₂ (0.05 mL) ve 5 mM

ferrosin (0.2 mL) karıştırılmıştır. Şelatlama aktivitesi 562 nm dalga boyunda yapılan ölçüm sonucu optik yoğunluktaki azalma belirlenmek suretiyle hesaplanmıştır (Decker ve Welch 1990).

$$\% \text{ Demir iyonu şelatlama aktivitesi} = 1 - \frac{OD2}{OD1} \times 100$$

OD2: örnek optik yoğunluğu

OD1: kör (PBS) optik yoğunluğu

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 Suşunun Antimikrobiyel Aktivitesi

Şanlıbaba vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada moleküler analiz yöntemleri kullanılarak *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun nisin A bakteriyosini ürettiği bulunmuştur. *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun antimikrobiyel aktivitesi; kuyu difüzyon yöntemi kullanılarak, gıda bozulma etmenleri yanında patojen bakteriler ve laktik asit bakterileri arasından seçilmiş 25 farklı indikatör mikroorganizmaya karşı belirlenmiştir.

Kuyu difüzyon testi sonuçlarına göre; Gram-negatif bakteriler olan *P. aureginosa* DSMZ 50071, *P. fluorescens* P1, *E. coli* ATCC 25922, *S. enteridis* ATCC 13075, *S. Typhimurium* SL1344, *K. pneumonia* ve *E. aerogenes* ATCC 13048'in *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun ürettiği nisin A bakteriyosinine karşı dirençli, nisin üreticisi *L. lactis* SIK 83, laktisin üreticisi *L. lactis* 105, *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* DSMZ 31 ve *Enterococcus* cinsine ait suşlar hariç diğer Gram-pozitif bakterilerin nisin A bakteriyosine karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1) .

Nisin üzerinde yürütülen çalışmalar sonucunda, laktokoklar tarafından 5 farklı nisin varyantının (Nisin A, Z, Q, F ve T) üretildiği tespit edilmiştir. Aynı gen bloğu tarafından kodlanan bu varyantlarda sadece bazı aminoasitlerin ve dehidre köprülerin pozisyonlarında farklılıklar bulunmaktadır (Wirawan vd. 2006).

Söz konusu farklılıkların nisin varyantlarının aktiviteleri üzerine etkili olduğuna dair doğrudan bir kanıt bulunmamasına rağmen, Nisin A ve Nisin Z'nin özellikle katı ortamlarda difüzyon kapasitelerinden kaynaklanan güçlü antimikrobiyel etkinliğe sahip oldukları değişik araştırmalarda öne sürülmüştür (Gonzales vd. 2010, Koca vd. 2010). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar da Nisin A üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun gıda kaynaklı hastalık ve bozulma etmeni Gram-pozitif bakterilere karşı çok güçlü bir antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Yukarıda özetlenen literatür verileri ile paralellik taşıyan bu sonuçlar, *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşu

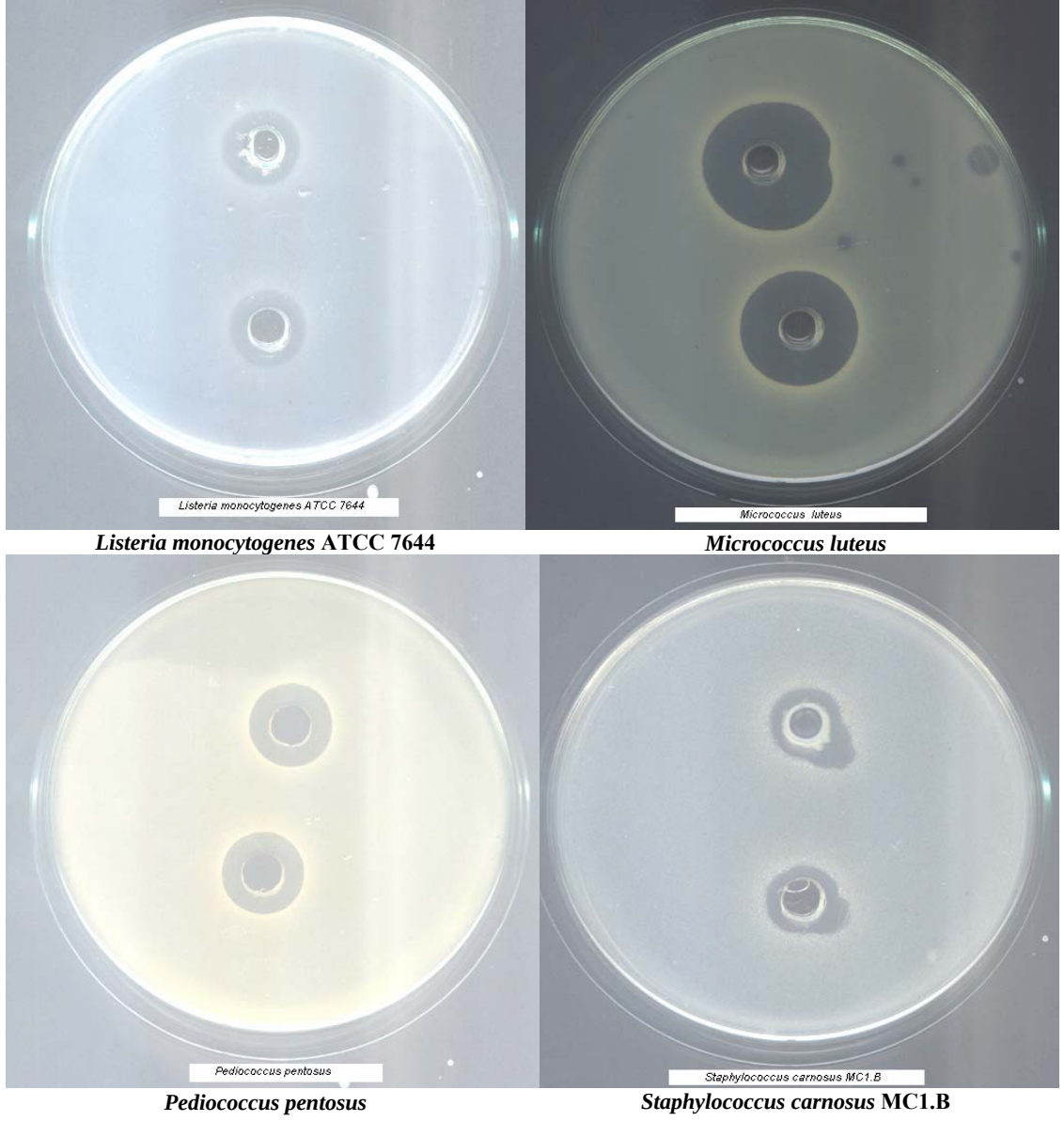
tarafından üretilen nisin A bakteriyosininin gıdaların korunması yanında, sağlık sektöründe de kullanılabileceğine işaret etmektedir.

Çizelge 4.1 *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun antimikrobiyel aktivitesi

İndikatör bakteriler	Gelişme ortamları		İnhibisyon zonu (mm)
<i>Lactococcus lactis</i> SIK 83	GM17B	30°C	-
<i>Lactococcus lactis</i> IL 1403	GM17B	30°C	12
<i>Lactococcus lactis</i> 105	GM17B	30°C	-
<i>Lactococcus lactis</i> JC 17	GM17B	30°C	12
<i>Lactobacillus sake</i> NCDO 2714	GM17B	30°C	20
<i>Pediococcus pentosaceus</i> FBB 61.1	GM17B	30°C	15
<i>Pediococcus pentosus</i>	MRSB	37°C	16
<i>Enterococcus faecalis</i> NCDO581	GM17B	30°C	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	LB	37°C	-
<i>Enterococcus faecium</i>	LB	37°C	-
<i>Pseudomonas aureginosa</i> DSMZ 50071	TSYB	37°C	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> P1	GM17B	30°C	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	LB	37°C	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	LB	30°C	15
<i>Listeria innocua</i>	LB	30°C	13
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	LB	37°C	-
<i>Staphylococcus carnosus</i> MC1.B	LB	37°C	15
<i>Salmonella enteridis</i> ATCC 13075	LB	37°C	-
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium SL1344	LB	37°C	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> DSMZ 6784	TSYB	37°C	17
<i>Micrococcus luteus</i>	LB	37°C	24
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	LB	37°C	-
<i>Bacillus cereus</i> DSMZ 31	TSYB	37°C	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11776	TSYB	37°C	11
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	LB	37°C	-

GM17B: Glukoz-M17 broth (%0.5 glukoz); MRSB: De Man Rogosa Sharpe Broth; LB: Luria Bertani Broth; TSYB: Tryptic Soy Yeast Broth

-: inhibisyon yok



Şekil 4.1 *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun kuyu difüzyon testi sonucu farklı indikatör bakterilere karşı belirlenen antimikrobiyel etkinliği

4.2 *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 Suşunun Antibiyotik Duyarlılık Düzeyinin Belirlenmesi

Disk difüzyon yöntemi kullanılarak yapılan antibiyotik duyarlılık çalışmalarında *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşu; hücre duvarı sentezini inhibe eden antibiyotiklerden penisilin G dışında amfisilin, sefazolin, meropenem, imipenem, vankomisin, amoksisilin-klavulanik asit ve seftiofura karşı duyarlı bulunmuştur. Bu suşun protein sentezi inhibitörü olan amikasin, gentamisin, kanamisin, spektinomisin, tetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin, azitromisin, florfenikol, siprofloksin, linkomisin, oflokasine karşı duyarlı, streptomisin ve neomisine karşı ise dirençli olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan nükleik asit sentezini inhibe eden tüm antibiyotiklere ve sitoplazma zarını etkileyen polimiksin B'ye karşı dirençli olduğu belirlenen LL27 suşu, en yüksek direnci sulfonamidler ve polimiksin B'ye karşı gösterirken, penisilin G'ye karşı çok düşük direnç içerdiği saptanmıştır (Çizelge 4.2, 4.3 ve Şekil 4.2).

Walther vd. (2008)'in sığırlardan izole ettikleri 41'i *L. lactis*, 31'i *L. garvieae* olmak üzere toplam 72 *Lactococcus* suşu ile yürüttükleri araştırmada tüm izolatların amoksisilin-klavulanik asit, gentamisin, penisilin ve vankomisine karşı duyarlı olduklarını belirlemişlerdir. Test edilen suşlardan hiçbiri kanamisine karşı yüksek direnç göstermezken *L. lactis* suşlarının tetrasikline direnci % 14.6, eritromisine direnci ise % 7.3 oranında bulunmuştur.

L. lactis üyeleri genellikle Gram-pozitif bakterilere karşı etkili antibiyotiklere (makrolidler, basitrasin, eritromisin, linkomisin, novobiosin, teikoplanin, vankomisin vd.), geniş spektrumlu antibiyotiklere (rifampisin, spektinomisin, kloramfenil vd.) ve β -laktam grubu antibiyotiklere (penisilin, ampisilin, amoksisilin, piperasilin, tikorsisilin, imipenem vd.) duyarlı iken; metronidazol, sefoksitin ve trimetoprime, Gram-negatif bakterilere etkili antibiyotiklere (fusidik asit, nalidiksik asit, polimiksin B vd.), amigdalinlere, gentamisine ve kanamisine karşı ise dirençli bulunmuştur. Tetrasiklin, sefolothin, nitrofurantoin ve sefotetan antibiyotiklerine karşı duyarlılık suştan suşa farklılık göstermektedir. Laktobasillerde, olduğu gibi, bazı nadir *L. lactis* suşları kloramfenikol, klindamisin, streptomisin, eritromisin ve tetrasikline karşı dirençlilik içermektedir (Florez vd. 2005, Amor vd. 2007).

Todorov vd. (2007)'nin insan vajinal salgısından izole ettiği *L. lactis* subsp. *lactis* HV219 suşunun probiyotik özelliklerini incelediği çalışmada; HV219 suşunun gelişimini tetrasiklin, amikasin, streptomisin, neomisin, sulfonamidler ve nalidiksik asid inhibe edemezken; kloramfenikol, ofloksasin, trimetoprim, siprofloksasin, sefazolin ve vankomisin'in inhibe ettiğini tespit etmiştir. Herreros vd. (2005) tarafından yapılan başka bir çalışmada; Armada peynirinden izole edilen 9 adet *L. lactis* suşunun antibiyotik dirençlilikleri araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda suşlardan 3'ünün amfisilin ve tetrasikline, 5'inin vankomisine, 6'sının kloramfenikol, kanamisin ve siprofloksine, 7'sinin rifampisine ve çalışılan tüm suşların ise trimetoprime karşı dirençli olduğu belirlenmiştir.

Türkiyeden izole edilen *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun antibiyotik dirençlilik profili, yukarıda özetlenen literatür verilerinde olduğu gibi büyük bir olasılıkla ekotipik farklılığın bir örneğini teşkil etmektedir. Laktokoklarda antibiyotik dirençliliği gelişimini teşvik eden en önemli unsur hayvan tedavisinde yüksek oranda ve kontrolsüz antibiyotik kullanımıdır. Starter kültür yada probiyotik olarak kullanılacak suşlarda antibiyotik dirençlilik, bu anlamda bir avantaj olarak görülmektedir. Zira antibiyotik tedavisi gören bireylerde sağlığı destekleyici olarak bünyeye alınan bu suşların sistemdeki kalıcılığı, antibiyotik dirençliliğinin tür içi ve türler arası aktarımı riskinin oluşmasına neden olabileceğinden tercih edilmemektedir. Bu genetik aktarımın söz konusu olduğu koşullarda özellikle bağırsak florasında antibiyotik direnç yayılımının teşvik edilmesi gibi istenmeyen bir durum ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun içerdiği antibiyotik dirençlilik özelliklerinin genetik doğasının belirlenmesi probiyotik kullanım potansiyeli açısından büyük önem taşımaktadır.

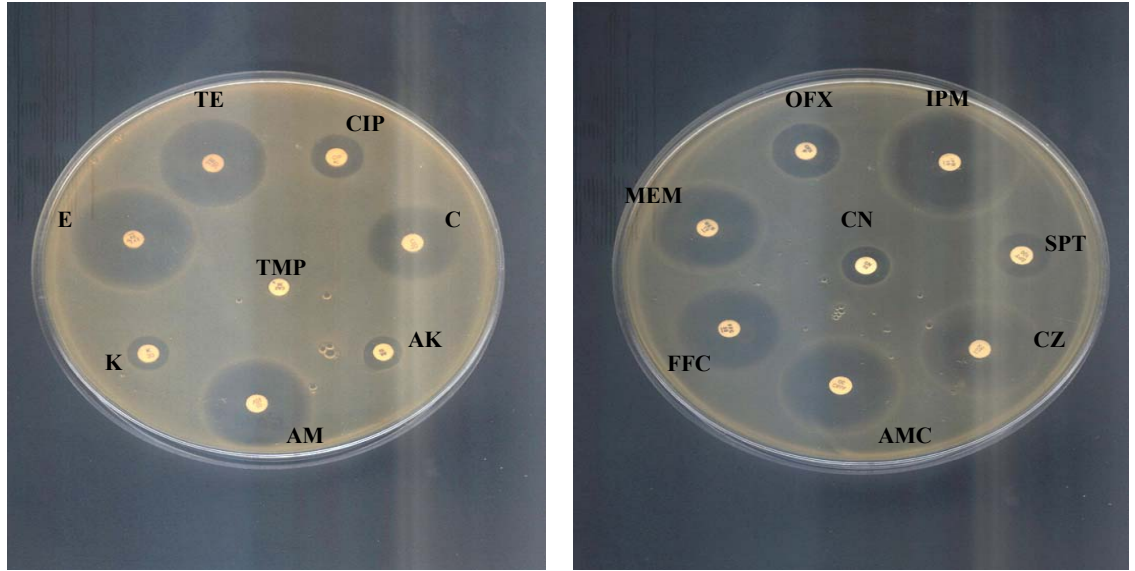
Çizelge 4.2 *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun antibiyotik duyarlılık profili

Antibiyotikler			Zon çapları (mm)
AM	Amfisilin	10 µg	29
CZ	Sefazolin	30 µg	22
MEM	Meropenem	10 µg	29
IPM	İmipenem	10 µg	35
VA	Vankomisin	30 µg	20
P2	Penisilin G	10 unite	-
AMC	Amoksisilin-klavulanik asit	30 µg	22
EFT	Seftiofur	30 µg	24
AK	Amikasin	30 µg	16
CN	Gentamisin	10 µg	14
K	Kanamisin	30 µg	15
SPT	Spektinomisin	100 µg	14
TE	Tetrasiklin	30 µg	25
C	Kloramfenikol	30 µg	23
E	Eritromisin	15 µg	30
AZM	Azitromisin	15 µg	23
S	Streptomisin	10 µg	-
N	Neomisin	5 µg	-
FFC	Florfenikol	30 µg	20
CIP	Siprofloksasin	5 µg	18
MY	Linkomisin	2 µg	19
OFX	Ofloksasin	5 µg	19
SD	Sülfodiazin	25 µg	-
TMP	Trimetoprim	5 µg	-
RD	Rifampisin	5 µg	-
S3	Sulfanomidler	300 µg	-
NA	Nalidiksik asit	30 µg	-
NV	Novobiosin	5 µg	-
PB	Polimiksin B	300 µg	-

-: dirençli

Çizelge 4.3 Antibiyotiklerin minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK)

Antibiyotikler		MİK (µg/mL)
P2	Penisilin G	≤4
S	Streptomisin	64
N	Neomisin	64
TMP	Trimethoprim	64
RD	Rifampisin	128
SD	Sülfodiazin	64
S3	Sulfanomidler	≥512
NA	Nalidiksik asit	64
NV	Novobiosin	32
PB	Polimiksin B	≥512



Şekil 4.2 *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun antibiyotik duyarlılık profili

4.3 *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 Suşunun Düşük pH, Pepsin, Pankreatin ve Safra Tuzlarına Karşı Direncinin Belirlenmesi

pH denemeleri sonunda LL27 suşunun canlılık oranı 3. saatin sonunda pH 2’de % 39.22 oranında, pH 3’de ise % 79.12 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.4). pH 2’de yürütülen pepsin uygulamasında 3. saatin sonunda tespit edilen canlılık oranı % 24.28 iken pH 3’de bu oran % 61.99 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.4 *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun düşük pH koşullarındaki canlılık düzeyi

Zaman (saat)	pH 7.2	pH 3		pH 2	
	log kob/mL	log kob/mL	% canlılık	log kob/mL	% canlılık
0	8.90	8.80	98.88	8.20	92.13
0.5	8.80	8.40	95.45	6.10	69.32
1	9.10	8.30	91.21	5.40	59.34
1.5	8.80	8.10	92.05	5.20	59.09
2	9.00	7.70	85.56	5.30	58.89
2.5	9.10	7.30	80.22	4.20	46.15
3	9.10	7.20	79.12	3.60	39.56
3.5	8.90	6.20	69.66	1.80	20.22
4	8.90	6.00	67.42	0	0

Çizelge 4.5 *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun pepsin varlığındaki canlılık düzeyi

Zaman (saat)	PBS (pH 7.2)	Pepsin (pH 3)		Pepsin (pH 2)	
	log kob/mL	log kob/mL	% canlılık	log kob/mL	% canlılık
0	11.08	8.60	77.67	8.26	74,62
1.5	11.11	7.56	68.05	5.48	49.37
3	11.20	6.40	57.22	3.29	29.46

Besinlerin sindirim sisteminden geçişi sırasında, midede kalma süresi ortalama 3 saattir (Vinderola and Reinheimer 2003). Bir günde pH'sı yaklaşık 2 olan gastrik sıvıdan 2.5 litre salgılandığı bilinmektedir (Charteris vd. 1998). Probiyotik mikroorganizmalar etki gösterecekleri bağırsak sistemine ulaşabilmek için bu gastrik sıvıyı geçmek zorundadırlar (Dunne vd. 2001). Araştırmamız sırasında pH 2 ve 3'de yürütölen pepsin uygulaması ile *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun sindirim sistemine ulaşması halinde gastrik koşullara direnç düzeyinin in-vitro olarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

Genellikle laktokokların sindirim sisteminin düşük pH'sında canlı kalamadıkları düşünölse de, Kimoto vd. (2007) tarafından laktokoklar üzerinde yürütölen çalışma sonucunda başlangıç sayısı 9.2 log kob/mL olan *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* N7 suşunun pH 2'de 2 saat inkübasyon sonucunda 5.4 log kob/mL'ye, pH 3'de 2 saat sonunda yalnızca 7.8 log kob/mL'ye düştüğü tespit edilmiştir. Vinderola ve Reinheimer (2003)'in starter olarak kullanılan laktik asit bakterileri ve probiyotik olarak kullanımda olan bakterileri probiyotik karakterleri ve biyolojik bariyerlere karşı dirençleri açısından karşılaştırdığı çalışmada; 9 adet *L. lactis* suşunun pH 2'deki gastrik sıvıda 3 saat sonunda canlılıklarında 6 log kob/mL'den fazla azalma olduğı, bu azalmanın pH 3'deki gastrik sıvıda 3.3-6 log kob/mL arasında değiştiğı saptanmıştır. Bunun yanı sıra probiyotik olarak kullanımda olan *Lactobacillus casei* türüne ait 5 suşta ve *Lactobacillus rhamnosus* türüne ait 2 suşta pH 2'deki gastrik sıvıda 3 saat sonundaki canlılıklarındaki azalmanın da 6 log kob/mL'den fazla olduğı tespit edilmiştir.

Elde edilen veriler, çalışılan LL27 suşunun gastrik koşullarda canlılığını yüksek düzeyde sürdürebildiğini ve dolayısı ile sindirim sistemine ulaştığında patojenlerle yarışma ve tutunma için yeterli sayıyı koruyabildiğini göstermektedir. Yukarıda özetlenen literatür verilerinden de açıkça göröleceğı üzere laktokoklar genellikle gastrik koşullara yüksek düzeyde duyarlı bulunmuştur. Türkiye kökenli LL27 suşunun bu direnç karakteristiğı stres koşullarına direnç bakımından da araştırılması gereken önemli bir farklılıktır.

L. lactis subsp. *lactis* LL27 suşu ile pH 8'de yürütölen pankreatin uygulamasında da 4 saat sonunda suşun canlılığını yine yüksek oranda sürdürdüğü tespit edilmiştir (izelge

4.6). Bunun yanı sıra % 3 'lük safra tuzu konsantrasyonunda 4 saat sonunda canlılığın % 40'ın üzerinde korunduğu saptanmıştır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6 *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun pankreatin ve safra tuzu varlığındaki canlılık düzeyi

Zaman (saat)	PBS (pH 7.2)	Pankreatin		Safra tuzu (% 0.3)	
	log kob /mL	log kob/mL	% canlılık	log kob/mL	% canlılık
0	11.08	10.55	95.29	6.09	55.04
4	11.24	9.35	83.24	4.76	42.36

İnce bağırsak ortamı simüle edilerek yürütülen denemelerde ise safra tuzu (% 0.3) ve pankreatin (pH 8) uygulaması, mikroorganizmaların probiyotik özelliklerinin tanımlanmasında kritik önem taşımaktadır. (Maragkoudakis vd. 2006). pH'sı yaklaşık 8 olan pankreatik sıvıdan proksimal ince bağırsağa günde ortalama 0.7 litre salgılanmaktadır (Charteris vd. 1998). İntestinal sistemdeki safra tuzunun fizyolojik konsantrasyonu ise % 0.3-0.5 arasında değişmektedir (Begley vd. 2005). Probiyotik mikroorganizmaların safra tuzuna direnç özelliğinin, konjuge safra tuzlarının hidrolize edilmesi suretiyle inhibitör etkiyi azaltan safra tuzu hidrolaz (BSH) aktivitesine bağlı olduğu öne sürülmektedir (Oh vd. 2000, Mourad ve Nour-Eddine 2006).

Vinderola ve Reinheimer (2003) tarafından gerçekleştirilen çalışmada *L. lactis* türüne ait 9 suшта % 0.3' lük safra tuzu varlığında suşların canlılık oranlarının % 21.3–76.6 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada probiyotik olarak kullanımda olan *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerine dahil suşlarda bu direnç düzeyinin % 3.6–93.5 oranında olduğu belirlenmiştir.

Todorov vd. (2007), insan vajinal salgısından izole ettiği *L. lactis* subsp. *lactis* HV219'un probiyotik özelliklerini araştırdığı çalışmasında suşun % 0.3'lük safra varlığında iyi geliştiğini tespit etmiştir.

İn-vitro koşullarda ince bağırsak sistemini simüle eden pankreatin ve safra tuzu konsantrasyonlarına karşı direnç yukarıda belirtilen bazı suşlar hariç genellikle laktokoklarda düşük düzeydedir. *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun bu koşullarda da yüksek düzeyde direnç göstermesi; gastrik sistemi geçtikten sonra ulaştığı ince bağırsak sisteminde de kalıcılığını koruyabileceğine ve probiyotik etkinliğini sürdürebileceğine işaret etmektedir.

4.4 *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 Suşunun Caco-2 ve CCL-221 Hücrelerine Tutunması

L. lactis subsp. *lactis* LL27 suşunun bağırsak yüzeyine tutunma yeteneğini belirlemek için yürütülen çalışmada Caco-2 ve CCL-221 hücreleri kullanılmış ve denemeler iki ayrı yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda Caco-2 hücrelerine tutunma oranı Maragkoudakis vd. (2006) tarafından önerilen yöntemle göre ~ % 2.5 olarak belirlenirken, Morita vd. (2002) tarafından önerilen yöntemle göre ise 13 bakteri/mikroskop alanı olarak belirlenmiştir. *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun CCL-221 hücrelerine tutunma oranı ise Morita vd. (2002) tarafından önerilen yöntemle göre 29 bakteri/ mikroskop alanı olarak tespit edilmiştir.

İn-vivo olarak bakteriyel tutunmanın incelenmesi zor olduğu için tutunma denemeleri; in-vitro koşullarda insan orjinli bağırsak hücreleri kullanılarak yapılmaktadır. Bu denemelerde en yaygın olarak kullanılan hücreler ise enterositlere benzeyen Caco-2 hücreleridir (Tuomola ve Salminen 1998). Yaptığımız araştırmalara göre CCL-221 kolorektal hücreler probiyotik potansiyelleri olan bakterilerin tutunma özelliklerinin araştırılmasında daha önce hiç kullanılmamıştır. Çalışmamız bu açıdan da bir ilk teşkil etmektedir.

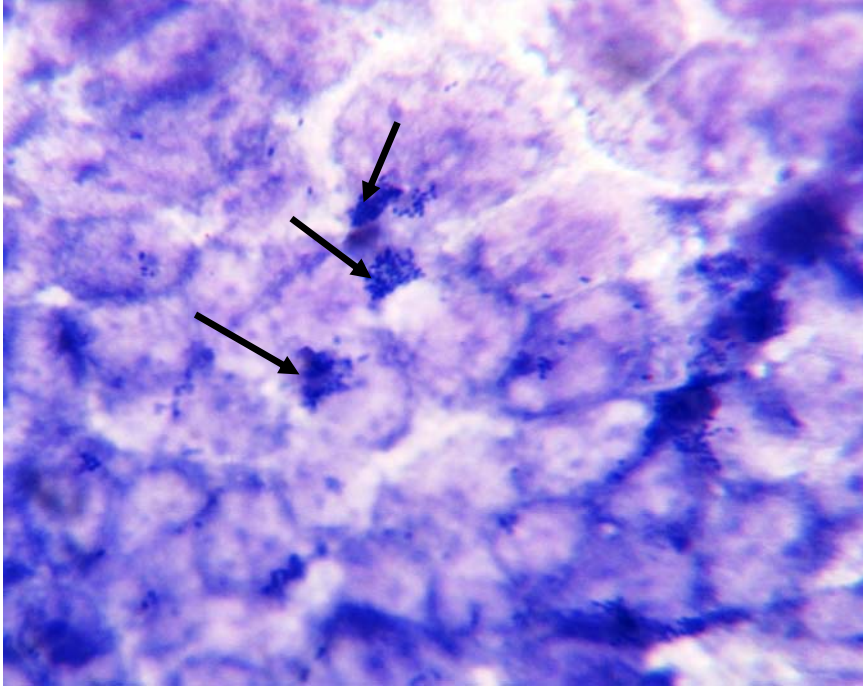
Kimoto vd. (1999) çeşitli süt ürünlerinde starter kültür olarak kullanılan *Lactococcus* cinsine dahil 9 adet suşun probiyotik özellikleri üzerine çalışmış ve Caco-2 hücrelerine tutunma tespiti için *L. johnsonii* suşunu pozitif kontrol, *L. acidophilus* suşunu ise negatif kontrol olarak kullanmıştır. Çalışma sonucunda 3 suşun tutunma yeteneğinde olmadığı, 5 suşun düşük düzeyde tutunma gösterdiği, *L. lactis* subsp. *lactis* NIAI 527'nin ise pozitif kontrol olarak kullanılan *L. johnsonii* ile aynı düzeyde tutunma gerçekleştirdiği

saptanmıştır. Bunun yanı sıra Todorov vd. (2007) 2 saatlik inkübasyonun ardından *L. lactis* subsp. *lactis* HV219 suşunun Caco-2 hücrelerine % 7 oranında tutunduğunu tespit etmiştir.

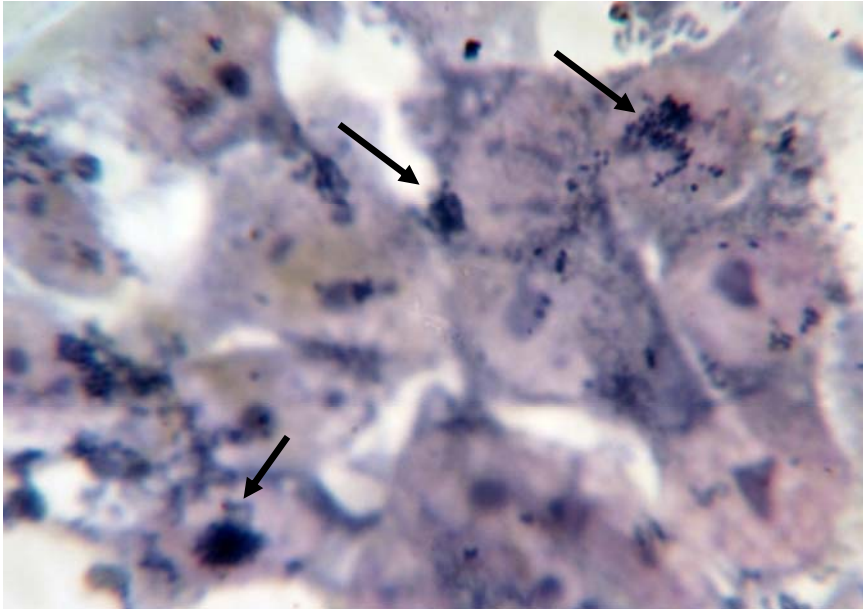
L. lactis subsp. *lactis* LL27 suşu ile yürütülen tutunma testleri sonucunda; çalışmada kullanılan farklı yöntemler karşılaştırılamamış ancak hücre tiplerinin tutunma oranını değiştirdiği ve her durumda söz konusu suşun adhezif özellik taşıdığı belirlenmiştir. Hangi yöntem ya da hücre tipi kullanılırsa kullanılsın, *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun ticari probiyotik preparatları için tanımlanan sınırlar içerisinde tutunma yeteneği içermesi, sistem kalıcılığında istenilen özellikleri taşıdığını kanıtlamaktadır.

L. lactis subsp. *lactis* LL27 suşu her iki hücre tipine de agregatlar halinde tutunma yeteneği içerdiğinden hücrelere geniş bir yayılma göstermediği tespit edilmiştir (Şekil 4.3, 4.4). Bununla birlikte SEM incelemesi sırasında *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun Caco-2 ve CCL-221 hücrelerinin her ikisinde de internalizasyona yol açtığı gözlenmiştir (Şekil 4.5, 4.6). Elde edilen görüntüler LL27 suşunun invazif olduğuna işaret etmektedir.

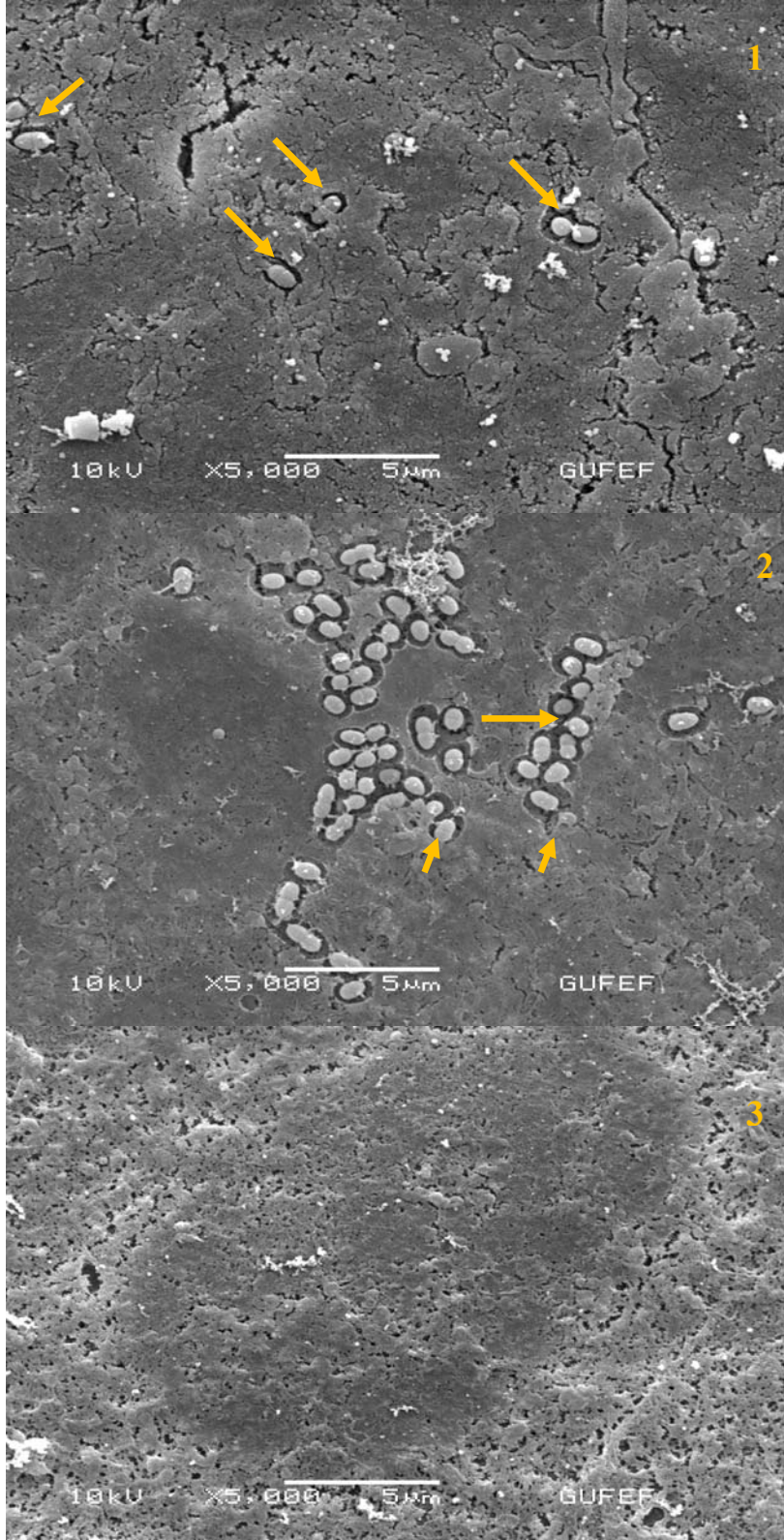
Listeria, *Salmonella* ve *Shigella* gibi konakçı hücreleri işgal etme yeteneği içeren patojenik bakteriler DNA esaslı vektörlerin memeli hücrelere aktarımında kullanılmaktadır (Schoen vd. 2004). Bununla birlikte, bu patojenlerin virulent fenotipe dönüşebilme riski bu genlerin kullanımında önemli bir kısıtlayıcı unsurdur (Dunham 2002). Oysa patojenite ile ilgili olmadığı bilinen suşların kullanımı halinde ökaryotik organizmalarda gen terapisi ve genetik ıslah çalışmalarının sağlıklı bir şekilde yürütülmesi mümkündür. Bu anlamda *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşu söz konusu çalışmalara yeni bir boyut kazandırma potansiyeli taşımaktadır. Laktokokların invazif özellik taşımadığını öne süren genel literatür verilerinin aksine (Innocentin vd. 2009) *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunda ilk tanımlamalara göre invazif yeteneğin bulunduğu tespiti bu tezin en önemli bulgusunu teşkil etmektedir. Bu bulgunun ileri genetik ve biyokimyasal çalışmalarla kesinlik kazanması, patojenitenin evrimine ışık tutacak verilerin sağlanmasında önemli bir adım teşkil edecektir.



Şekil 4.3 *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun Caco-2 hücrelerine tutunması (x1000)
* oklar bakterilerin agregat tutunmalarını göstermektedir

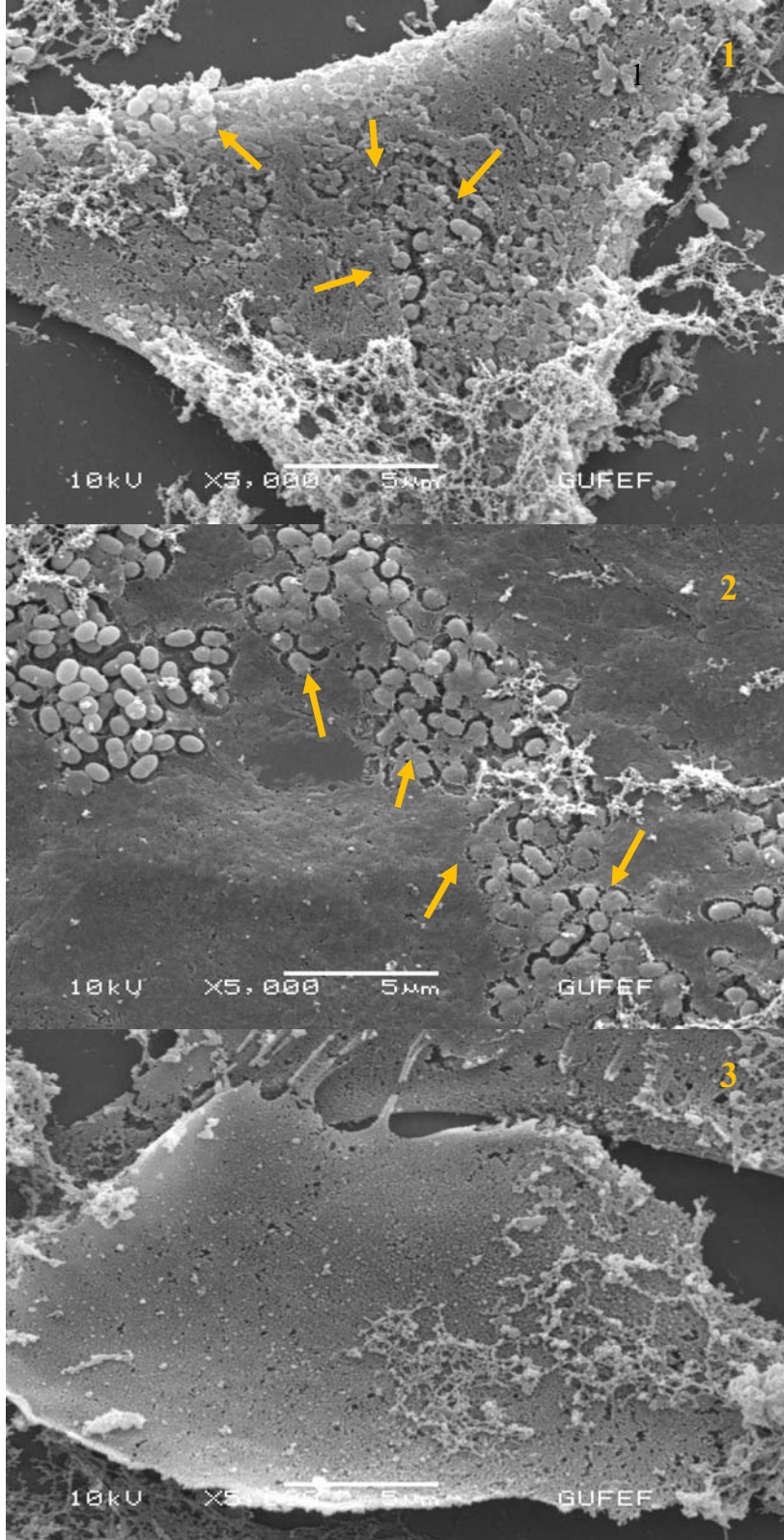


Şekil 4.4 *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun CCL-221 hücrelerine tutunması (x1000)
* oklar bakterilerinin agregat tutunmalarını göstermektedir



Şekil 4.5 *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun Caco-2 hücrelerine tutunmasının SEM görüntüsü (x5000)

*1. ve 2. görüntüdeki oklar bakteri internalizasyonu, 3. görüntü ise bakteri ile muamele edilmiş hücreyi göstermektedir.



Şekil 4.6 *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun CCL-221 hücrelerine tutunmasının SEM görüntüsü (x5000)

*1. ve 2. görüntüdeki oklar bakteri internalizasyonu, 3. görüntü ise bakteri ile muamele edilmiş hücreyi göstermektedir.

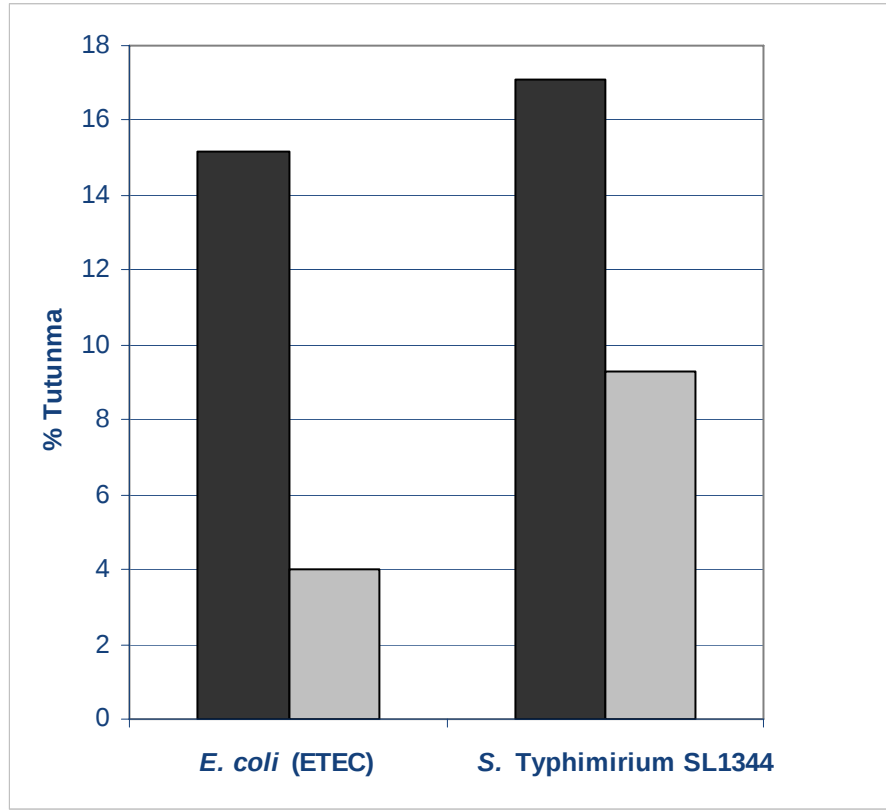
4.5 *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 Suşunun Patojen Bakterilerin Caco-2 Hücrelerine Tutunmalarını Engellemesi

E. coli ETEC suşunun Caco-2 hücrelerine tutunma yeteneğinin; önceden *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşu tutundurulmuş Caco-2 hücreleri kullanılarak araştırıldığı çalışmada % 73.69 oranında engellendiği saptanmıştır. Aynı deneme *S. Typhimurium* SL1344 ile yürütüldüğünde ise, bu patojenin Caco-2 hücrelerine tutunma yeteneğinin *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşu tarafından % 45.41 oranında engellendiği belirlenmiştir (Şekil 4.7).

Probiyotik suşun inhibisyon etkisi; organik asit, hidrojen peroksit, bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddeleri üretim yeteneği ya da patojen mikroorganizmaların epitel yüzeylere tutunmalarını engelleme ve besin maddeleri için rekabet mekanizmalarıyla açıklanmaktadır (Rastall vd. 2005). Bağırsak epiteline tutunma ve kolonizasyon için probiyotiklerin patojenlerle yarışması, sindirim kanalının korunması için gerekli ve önemli mekanizmalardan biridir (Jankowska vd. 2008). Tutunmanın engellenmesi bağırsakta patojen kolonizasyonunu önlemekte ve böylece konakçı sistemi enfeksiyondan korunmaktadır (Tuomola vd. 1999).

L. johnsonii La1, *Bifidobacterium* Ca1 ve F9, *L. acidophilus* LB, *L. plantarum* ACA-DC 146 ve *L. paracasei* subsp. *paracasei* ACA-DC 221 suşları ile yürütülen bir çalışmada; *L. plantarum* ACA-DC 146 suşunun *E. coli* CFA 1'in tutunmasını % 41, *S. Typhimurium* SL1344'ün tutunmasını ise % 14 oranında azalttığı belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan diğer suşlar, *S. Typhimurium*'un tutunması üzerine herhangi bir etki göstermemiştir (Maragkoudakis vd. 2006).

L. lactis suşlarının patojenlerin tutunmasını engellemesi etkinliğine dair literatür verileri bulunmamaktadır. Bu açıdan öncü nitelik taşıyan çalışmamızın in-vivo denemelerle hayvan modellerinde de doğrulanması büyük önem taşımaktadır. Ancak in-vitro çalışma sonuçları en önemli bağırsak kökenli patojenler ile *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun bağırsak epiteline tutunmada yarışma yeteneği içerdiğine işaret etmektedir. Bu yetenek söz konusu suşun probiyotik potansiyelinin gücünü göstermesi açısından çalışmamızda kritik önem taşımaktadır.



Şekil 4.7 *E.coli* (ETEC) ve *S. Typhimurium* SL1344 suşlarının tutunma oranları (■) inhibisyonsuz tutunma oranı (■) LL27 suşunun engellemesi sonucundaki tutunma oranı

4.6 Hidrofobisite

L. lactis subsp. *lactis* LL27 suşunun hücre süspansiyonunun n-hekzadekan ile muamele edilmeden önceki optik yoğunluğu (OD) 0.93 ile 1.09 iken, n-hekzadekan ile muamelesinin ardından bu yoğunluk 0.15 ile 0.18 arasında değişim göstermiştir. 6 paralel olarak gerçekleştirilen çalışmanın sonunda *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun hidrofobisitesi 83.48 ± 1.45 olarak hesaplanmıştır.

Mikroorganizmaların dış yüzeyinin hidrofobik doğası o bakterinin konakçıya tutunması ile ilgilidir. Bu özellik, yarışmada avantaj sağlayabilmesi ve dolayısıyla bakterinin insan gastrointesitinal sisteminde varlığını devam ettirebilmesi için önemlidir. Mikroorganizmaların epitel hücrelere adezyonunu değerlendirmede bir araç olan, n-

hekzadekana mikrobiyel adezyon geçerli bir kalitatif fenomoneolojik yaklaşımdır (Vinderola ve Reinheimer 2003).

Vinderola ve Reinheimer (2003) tarafından gerçekleştirilen çalışmada 9 ayrı *L. lactis* suşunun hidrofobisite değerleri % 14.9-31.3 aralığında olduğu belirlenmiştir. Yüksek hidrofobisitenin bakterilere gastrointestinal sisteme daha kuvvetli tutunma sağlamasıyla diğer bakterilerle yarışmada avantajlı olmalarına neden olduğu düşünülmektedir (Naidu vd. 1999, Todorov vd. 2007). Buna karşın, Ouwehand vd. (1999) probiyotik mikroorganizmaların intestinal mukusa tutunmaları üzerine yaptığı çalışmada bakterilerin yüzey hidrofobisite ile tutunma yetenekleri arasında bir korelasyon olmadığını göstermiştir. *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun hidrofobisite özelliği sınırlı literatür verileri ile karşılaştırıldığında, denenen laktokok suşlarından daha yüksek bir hidrofobisite özelliğine sahip olduğu görülmektedir. Bu durum LL27 suşunun yüzey karakteristikleri bakımından da atipik bir suş olduğuna işaret etmektedir. İleri biyofiziksel analizler ile bu karakteristiklerin tanımlanması da çalışmanın devamı olacak projelerin kapsamı içerisine alınmıştır.

4.7 *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 Suşunun Antioksidan Etkisi

L. lactis subsp. *lactis* LL27 suşunun DPPH süpürme kapasitesi % 75 ± 3 , demir iyonu şelatlama aktivitesi de % 29.5 ± 3 olarak bulunmuştur.

Serbest radikaller, solunum ve bazı hücre aracılı immün fonksiyonlarda olduğu gibi vücudun oksijeni kullanmasıyla sürekli üretilirler (Barros vd. 2007). Farmer vd. (1942)'nin yaygın olarak kabul gören önermesine göre; serbest radikaller, diğer reaktif oksijen çeşitleri ve oksidasyon proseslerinde üretilen toksik ürünler biyolojik moleküllere saldırabilir ve zarar verebilir. Serbest radikallerin saldırdığı moleküller de serbest radikal üretebilirler. Serbest radikal zincir reaksiyonlarının sonucunda canlı organizmalarda büyük zararlar ortaya çıkabilmektedir. Serbest radikal üretimi ve birçok hastalığın yakın ilişki içerisinde olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından belirlenmiştir (Halliwell ve Gutteridge 1984, Halliwell ve Gutteridge 1989). Bu nedenle *L. lactis*

subsp. *lactis* LL27 suşunun bir serbest radikal olan DPPH'i süpürme kapasitesi çalışılmış ve elde edilen sonuç suşun antioksidatif etkisi olduğunu göstermiştir.

Kararlı bir serbest radikal olan DPPH, kararlı bir diyamanyetik molekül haline gelen elektron ya da hidrojen radikali olarak kabul edilir (Halliwell ve Gutteridge 1989). *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun serbest radikal süpürme kapasitesi in-vitro olarak test edilmiş ve DPPH radikaliye karşı yüksek süpürme kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Serbest radikal süpürme kapasitesi, antioksidanların lipit peroksidasyonunu inhibe ettiği bilinen mekanizmalardan biridir (Soares vd. 1997). *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium*'un serbest radikalleri in-vitro süpürme kapasiteleri ile ilgili yapılan çalışma da çok azdır. Lin ve Chang (2000) *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 suşunun DPPH süpürme kapasitesini % 43.2, *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 suşunun süpürme kapasitesini ise % 52.1 olarak bulmuştur. Wang vd. (2009) doza bağlı bir metodla yaptığı çalışmada *Lactobacillus fermentum*'un süpürme kapasitesini 10^9 kob/mL için % 90 düzeyinde saptanmıştır. Bu veriler ve bizim elde ettiğimiz sonuçlar DPPH süpürme kapasitesinin tür, suş ve doza bağlı olduğunu göstermektedir.

Reaktif oksijen türlerinin yüksek üretimi sonucu, metal katalizleme dönüşümü küresel oksidatif hasarın genel patolojisini ortaya koymaktadır (Nishimura vd. 2004). Bu nedenle, ağız yoluyla alınan fazla miktardaki demir kolon mukozasında lipit peroksidasyonuna neden olur. Laktik asit bakterilerinin şelatlama aktiviteleri, bakterilerin hücre duvarında yer alan fizyolojik şelatorler yardımıyla gerçekleşmektedir. Bu nedenle çalışmada sağlamlığından emin olunan hücreler kullanılmıştır. Çalışma sonucunda *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun yüksek seviyede oksijene karşı dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç söz konusu suşun bağırsak mukozasındaki oksidatif strese karşı koyabileceğinin açık bir kanıtıdır.

5. SONUÇ

Bu araştırma kapsamında, Nisin A üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun probiyotik özellikleri; mide asitliğine direnci, bağırsak sisteminde yaşamda kalma kabiliyeti, bağırsak epiteline tutunma yeteneği ve bağırsak patojenleri ile epitel hücrelerine tutunmada yarışmacı olup olmadığı incelenerek karakterize edilmiştir. Tüm bu araştırmalardan elde edilen veriler, Türkiye kökenli olan bu suşun yüksek düzeyde probiyotik potansiyeli taşıdığına işaret etmektedir. Araştırmamız kapsamında tüm denemelerin in-vitro koşullarda gerçekleştirilmiş olması nedeni ile nihai sonuçlar için, denemelerin hayvan model sistemleri kullanılarak yapılacak çalışmalar ile de doğrulanması ve bu suş için patent çalışmalarına başlanması gerekmektedir. Ciddi bir maliyet ve iş yükü isteyen bu çalışmalar için kamu ve özel sektör desteği zorunludur.

Araştırmanın bir diğer kritik bulgusu *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun invazif özellik taşıdığının tanımlanmasıdır. Bu bulgu *L. lactis* türü için yeni bir bulgudur ve söz konusu türün evrimine yeni bir boyut ve bakış açısı kazandıracak nitelik taşımaktadır. Bu nedenle *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunda tespit edilen invazif özelliğin genetik ve biyokimyasal doğasının belirlenmesi yanında, söz konusu özelliğin patojenite ile ilişkisinin tanımlanması çalışmalarına da başlanmıştır.

Nisin üreticisi olması nedeni ile *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun in-vivo koşullarda bağırsak kökenli patojenlere karşı antibakteriyel etkinliğinin tanımlanması ise, özellikle kontrollü salınımın gerçekleştirildiği lipozom sistemleri ile tasarlanmış ve çalışmalara başlanmıştır.

KAYNAKLAR

- Akkoç, N. 2008. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MBL9 suşunda endüstriyel öneme sahip özelliklerin genetik determinantları. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Amor, M.S., Florez, A.B. and Baltasar, M. 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 24; 559-570
- Aso, Y. and Akazan, H. 1992. Prophylactic effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer. *Urol. Intl.*, 49; 125-129.
- Badis, A., Guetarni, D., Boudjema, B.M., Henni, D.E. and Kihal, M. 2004. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 21; 579-588.
- Barros, L., Ferreira, M., B., Querios, B., Ferreira, C.F.R. and Baptista, P. 2007. Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chem.*, 103; 413-419.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. and Turk, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45; 493-496.
- Begley, M., Gahan, C.G. and Hill, C. 2005. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29; 625-651.
- Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L. and Cogan, T.M. 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11; 259-274.
- Billoo, A.G., Memon, M.A., Khaskheli, S.A., Murtaza, G., Iqbal, K., Shekhani, M.S. and Siddiqi, A.Q. 2006. Role of a probiotic (*Saccharomyces boulardii*) in management and prevention of diarrhoea. *World Journal of Gastroenterology*, 12; 4557-4560.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*, 18; 1199-1200
- Boris, S. and Barbes, C. 2000. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes Infect.* 4; 543-546.
- Brassart, D., Neeser, J.-R., Michetti, P. and Servin, A.L. 1994. The selection of dairy bacterial strains with probiotic properties based on their adhesion to human intestinal epithelial cells. In: *Proceedings of Lactic '94*, 7-9 September 1994, Caen, France, 201 -212.

- Brink, M., Todorov, S.D., Martin, J.H., Senekal, M. and Dicks, L.M.T. 20006. The effects of probiotics on production of antimicrobial compounds, resistance to growth at low pH and in the presence of bile, and adhesion to human intestinal mucus. *J. Appl. Microbiol.* 100; 813-820.
- Caridi, A. 2002. Selection of *Escherichia coli* inhibiting strains of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 29; 303-308.
- Casalta, E., Montel, M.C. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126; 271-273.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. and Collins, J.K. 1998. Development of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human intestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* 84: 759-768.
- Ciarlet, M. and Estes, M.K. 2001. Interactions between rotavirus and gastrointestinal cells. *Curr. Opin. Microbiol.*, 4; 435-441.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F. and Chikindas, M. L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71; 1-20.
- Collins, J.K., Thornton, G. and Sullivan, G.O. 1998. Selection of probiotic strains for human applications. *International Dairy Journal*, 8; 487-490.
- Conway, P., Gorbach, S.L. and Goldin, B.R. 1987. Survival of Lactic acid bacteria in human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of Dairy Science*, 70; 1-12.
- De Boever, P., Wouters, R., Verschaeve, L., Berckmans, P., Schoeters, G. and Verstraete, W. 2000. Protective effect of the bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* against bile salt cytotoxicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53; 709-714.
- Decker, E.A. and Welch, B. 1990. Role of ferritin a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38; 674-677.
- Delgado, S., O'Sullivan, E., Fitzgerald, G. and Mayo, B. 2007. Subtractive screening for probiotic properties of *Lactobacillus* species from the human gastrointestinal tract in the search for new probiotics. *J. Food Sci.*, 72; 310-315.
- Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technology.*, 44(11); 100-117.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J. and Hugenholtz, J. 1996. Applications of the bacteriocin nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69; 193-202.

- Delves-Broughton, J. 2005. Nisin as a food preservative. Feature paper. Food Australia, 57 (2); 525-527.
- Dunham, S.P. 2002. The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine. Res Vet Sci. 73:9-16.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., C O'Sullivan, G., Shanahan, F., and Collins J.K. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: Correlation with in vivo findings. The American Journal of Clinical Nutrition, 73; 386-392.
- FAO-WHO. 2001. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria
- Farmer, E.H., Bloomfield, G.F., Sundralingam, A., Sutton, D.A. 1942. The course and mechanism of autoxidation reactions in olefinic and polyolefinic substances, including rubber. Trans Faraday Soc., 38; 348-356
- Fernandez, M.F., Boris, S., Barbes, C. 2003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. Journal of Applied Mikrobiology, 94; 449-455.
- Floch, M.H., Binder, H.J., Filburn, B., Gershengoren, W. 1972. The effect of bile acids on intestinal microflora. Am J Clin Nutr, 25; 1418-26.
- Florez, A.B., Delgado, S., Mayo, B. 2005. Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. Can. J.Microbiol, 51; 51-58.
- Fonseca, F., Beal, C., Corrieu, G. 2000. Method for quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. Journal of Dairy Research, 67; 63-80.
- Fooks, L.J., Fuller, R., Gibson, G.R. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. International Dairy Journal, 9; 53-61.
- Fooks, L.J. and Gibson, G.R. 2002. Probiotics as modulators of the gut flora. British Journal of Nutrition, 88; 39-49.
- Fukushima, Y., Kawata, Y., Hara, H., Terada, A. and Mitsuoka, T. 1998. Effect of probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. Int. J. Food Microbiol., 42; 39-44.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology, 66; 365-378.

- Furet, J.P., Queene, P. and Talliez, P. 2002. Quantification de bacteries lactiques parPCR quantitative. Sci. Aliments, 22; 33–44.
- Gismondo, M.R., Drago, L. 1999. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. International Journal of Antimicrobiol Agents, 12; 287-292.
- Gonzales, S.Y., Dominguez, J., Almenderez, B.E., Barragan; L.A., Gonzales, C.R. 2010. Optimization of Nisin production by *Lactococcus lactis* UQ2 using supplemented whey as alternative culture medium. Food Science, 75; 347-353.
- Guandalini, S., Pensabene, L., Zikri, M. A., Dias, J. A., Casali, L. G., Hoekstra, H., Kolacek, S., Massar, K., Meceticturk, D., Papadopoulou, a., de Sousa, J. S., Sandhu, B., Szajewska, H. and Weizman, Z. 2000. *Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhoeas: a multicenter European trial. Gastroenterol Nutr., 30; 54.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem. J., 219-4
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1989. Free radical tissue damage: Protective role of antioxidant nutrients. FASEB J.,1;441-445
- Hansen, J. N. 1994. Nisin as a model food preservative. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 34(1); 69-93.
- Herreros, M.A., Sandoval, H., Gonzalez, L., Castro, J.M., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E 2005. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). Food microbiology, 22; 455-459.
- Heyman, M. and Menard, S. 2002. Probiotic microorganisms how they affect intestinal patophysiology. Cell Mol. Life Sci., 59; 1151.
- Hill, M.J., Draser, B.S. 1968. Degradation of bile salts by human intestinal bacteria. Gut 9; 22–7.
- Hindre, T., Didelot, S., Le Pennec, J-P. Haras, D., Dufour, A. and Vallée-Réher, K. 2003. Bacteriocin detection from whole bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. Applied and Environmental Microbiology, 69(2); 1051-1058.
- Hoffman, A.F., Molino, G., Milanese, M., Belforte, G. 1983. Description and stimulation of a physiological pharmacokinetic model for the metabolism and enterohepatic circulation of bile acids in man. J Clin Invest, 71; 1003–1022.
- Hosel, C.E. and Altwein, J.F. 2005. The probiotic approach: an alternative treatment option in urology. Eur. Urol. 47; 288-296.

- Hylemon, P.B. and Glass, T.L. 1983. Biotransformation of bile acids and cholesterol by the intestinal microflora. In: Hentges DJ, ed. Human intestinal microflora in health and disease, Academic Pres, 189-213, New York
- Innocentin, S., Guimaraes, V., Miyoshi, A., Azevedo, V., Langella, P., Chatel, J.M., and Lefevre, F. 2009. *Lactococcus lactis* expressing either *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A or *Listeria monocytogenes* internalin A can efficiently internalize and deliver DNA in human epithelial cells. *Appl Environ Microb.* 4870-4878.
- Jankowska, A., Laubitz, D., Antushevich, H., Zabielski, R., Grzesiuk, E. 2008. Competition of *Lactobacillus paracasei* with *Salmonella enterica* for Adhesion to Caco-2 cells. *Journal of Biomedicine an Biotechnology*, 357964.
- Kim, H. S., Park, H., Cho, I. Y., Paik, H. D. and Park, E. 2006. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus polyfermenticus*, Bispan strain, modulates natural killer cell and Tcell subset populations and immunoglobulin g levels in human subjects. *Journal of Medicinal Food*, 9; 321-327.
- Kimoto, H., Kurisaki, J., Tsuji, N.M., Ohmomo, S., Okamoto, T. 1999. Lactococci as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile. *Letters in Applied Microbiology*, 29; 313-316.
- Kimoto, H., Mizumachi, K., Nomura, M., Kobayashi, M., Fujita, Y., Okamoto, T., Suzuki, I., Tsuji, T., Kurisaki, J., Ohmomo, S. 2007. *Lactococcus* sp. As Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria. *JARQ*, 41(3); 181-189
- Klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochemie*, 70; 337.
- Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Rev.*, 12; 39-86.
- Klijn, N., Weerkamp. A.H. and de Vos. W.M. 1991. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16s rRNA and specific DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57; 3390-3393.
- Kneifel, W., Mattila-Sandholm, T., Wright, A. 1999. Probiotic Bacteria-Detection and estimation in fermented and non-fermented dairy products. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 3; 1783- 1789.
- Koca, E., Akkoç, N., Şanlıbaba, P., Akçelik, M. 2010. Nisin dirençlilik ve regülasyon genlerinin Laktisin 481 üreticisi *L. lactis* subsp. *lactis* MBL9 suşunda anlatımı. *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*. 16; 765-769.
- Laurens-Hattingh, A. and Viljoen, B. C. 2001. Yogurt as probiotic carrier food. *Int. Dairy J.*, 11; 1-17.

- Lee, N.K. and Paik, H.D. 2001. Partial characterization of lacticin NK24, a newly identified bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK24 isolated from Jeot-gal. Food Microbiology, 18; 17-24.
- Lee, Y.K. and Salminen, S. 1995. The coming age of probiotics. Trends Food Sci. Technol., 6; 241-5.
- Lilly, D.M. and Stillwell, R.H. 1965. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. Science, 147; 747-748.
- Lin, M. and Chang, F. 2000. Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Digestive Diseases and Sciences, 45(8); 1617-1622.
- Liu, W. and Hansen, J. N. 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol., 56; 2551-2558.
- Maragkoudakis, A.P., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopaulos, G., Pot, B. and Tsakalidou, E. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. International Dairy Journal, 16; 189-199.
- Margaret A., Wertz Riley and John E. 2002. Bacteriocins: Evolution, ecology, and application. Annu. Rev. Microbiol., 56; 117-37.
- Metchnikoff, E. 1907. Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. The prolongation of life, 161-183.
- Mitsuoka, T. 1990. Role of intestinal flora in health with special reference to dietary control of intestinal flora. Microbiology Application in Food Technology, London, 135-148.
- Morita, H., He, F., Fuse, T., Ouwehand, A.C., Hashimoto, H., Hosoda, M., Mizumachi, K. and Kurisaki, J.I. 2002. Adhesion of lactic acid bacteria to Caco-2 cells and their effect on cytokine secretion. Microbiol Immunol., 46 (4); 293-297.
- Mourad, K. and Nour-Eddine, K. 2006. Microbiological study of naturally fermented Algerian green olives: Isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts along with the effects of brine solutions obtained at the end of olive fermentation on *Lactobacillus plantarum*. Grasas y Aceites, 57; 292-300.
- Naidu, A.S., Bidlack, W.R. and Clemens, R.A. 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 39; 13-26.
- Nes, I. F., Holo, H., Gunnar Fimland, Havard Hildeng-Hauge, and Nissen-Meyer, J. 2001. Unmodified peptide-bacteriocins (Class II) produced by lactic acid bacteria. In: Peptide Antibiotics. Eds. Dutton, Haxell, McArthur & Wax. Marcel Decker, New York. 81-115.

- Nes, I.F. and Tagg, J.R. 1996. Novel lantibiotics and their pre-peptides. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69; 89–97.
- Nishmura, T., Sakudo, A., Nakamura, I., Lee, D.C., Taniuchi, Y., Saeki, K., Natsumoto, Y. and Onodera, T. 2004. Cellular proion protein regulates intracellular hydrogen peroxide level and prevents copper-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 323; 218-222
- Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K. and Panyim, S. 2003. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from *nham*, a traditional Thai fermented sausage. *Int. J. Food Microbiol.*, 81(2); 137-145.
- O’Sullivan, L., Ryan, M.P., Ross, R.P. and Hill, C. 2003a. Generation of food-grade lactococcal starters which produce the lantibiotics lacticin 3147 and lacticin 481. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6); 3681-3685.
- Oh, S., Kim, S.H. and Worobo, R.W. 2000. Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *J. Dairy Sci.*, 83; 2747-2752.
- Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Grünland, M.M., Isolavri, E. and Salminen, S.J. 1999. Adhesion of probiotic microorganisms to intestinal mucus. *International Dairy Journal*, 9; 623-630.
- Ouwehand, A.C. and Vesterlund, S. eds. 2004. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects*. New York: Marcel Dekker Inc.
- Parracho, H., McCartney, A. L. and Gibson, G.R. 2007. Probiotics and prebiotics in infant nutrition. *Proceeding of the Nutrition Society*, 66; 405-411.
- Rasic, J. L., Vujicic, I. F. and Skrinjar, M. 1992. Vulic, M., Assimilation of cholesterol by some cultures of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Biotechnol. Lett.*, 14; 39-44.
- Rastall, R., Gibson, G.R., Gill, H.S., Guarner, F., Klaenhammer, T.R., Pot, B., Reid, G., Rowland, I.R. and Sanders, M.E. 2005. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiology Ecology*, 52; 145-152.
- Reid, G., Bruce, A. W., Fraser, N., Heinemann, C., Owen, J. and Henning, B. 2001. Oral probiotics can resolve urogenital infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 30; 49-52.
- Reid, G. and Burton, J. 2002. Use of *Lactobacillus* to prevent infections by pathogenic bacteria. *Microbes Infect.* 4: 319-324.

- Reid, G. and Bocking, A. 2003. The potential for probiotics to prevent bacterial vaginosis and preterm labor. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 189; 1202-1208.
- Rolfe R.D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *Journal of Nutrition.* 130; 396-402.
- Rossi, E. A., Vendramini, R. C., Carlos, I. Z., Pei, Y. C. and DeValdez, G. F. 1999. Development of a novel fermented soymilk product with potential probiotic properties. *Eur. Food Res. Technol.*, 209; 305-307.
- Ross, P.R., Morgan, S. and Hill, C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79; 3-16.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J. and Sandholm, T.M. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84; 197-215.
- Salama, M., Sandine, W. and Giovannoni, S. 1991. Development and application of oligonucleotide probes for identification of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Appl. Environ. Microbial.*, 57; 1313- 1318.
- Salminen, S., VonWright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., DeVos, W. M., Fondén, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S. E. and Mattila-Sandholm, T. 1998. Demonstration of safety of probiotics. *Int. Journal Food Microbiology*, 44; 93-106.
- Salminen, S., Gibson, G.R., McCartney, A.L. and Isolauri, E. 2004. Influence of mode of delivery on gut microbiota composition in seven year old children. *Gut*, 53; 1388-1389.
- Sanders, M.E. and Veld, J.H. 1999. Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labelling issues. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76; 293-315.
- Schlegel, H.G. 1997. *General Microbiology*, Cambridge University Press, 163, New York, USA.
- Schleifer, K.H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Balz, R., Collins, M.D. and Fischer, W. 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 6; 183–195.
- Schleifer, K.H. 1987. Recent changes in taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review*, 46 (3); 201–203.
- Schleifer, K.H. and Killper-Bälz, R. 1987. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *Systematic and Applied Microbiology*, 10; 1–19.

- Schoen, C., Strizker, J., Goebel, W., and Pilgrim, S. 2004. Bacteria as DNA vaccine carriers for genetic immunization. *Int J Med Microbiol.*, 294; 319-335.
- Soares, J.R., Dins, T.C.P., Cunha, A.P. and Ameida, L.M. 1997. Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Radic. Res.*, 26; 469-478
- Stiles, M.E. and Holzapfel, H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36; 1-29.
- Sullivan, A. and Nord, C.E. 2005. Probiotics and gastrointestinal diseases. *J. of Int. Medicine*, 257; 78-92.
- Szajewska, H., Kotowska, M., Mrukowicz, J.Z., Armanska, M. and Mikołajczyk, W. 2001. Efficacy of *Lactobacillus* GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants. *J. Pediatr.*, 138; 361.
- Şanlıbaba, P., Akkoç, N., Akçelik, M. 2009. Identification and characterisation of antimicrobial activity of nisin A produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL27. *Czech J. Food Sci.*, 27; 55-64.
- Tagg, J.R. and McGiven, A.R. 1971. Assay system for bacteriocins. *Appl. Microbiol.*, 21; 943.
- Taylor, G. R. J. and Williams, C. M. 1998. Effects of probiotics and prebiotics on blood lipids. *Brit. J. Nutr.*, 80; 225-230.
- Teixeira, L., Luica, V., Merquior, V.L., Vianni, M.C., Corvako, M.G.S., Fracalanza, S.E.L., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J. and Facklam, R.R. 1996. Phenotypic and genotypic characterization of a typical *Lactococcus garreriae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garreriae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46(3); 664-668.
- Teuber, M., Geis, A. and Neve, H. 1991. The genus *Lactococcus*. Springer-Verlag, 1482-1501, New York
- Todorov, S., Onno, B., Sorokine, O., Chobert, J.M., Ivanova, I. and Dousset, X. 1999. Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. *International Journal of Food Microbiology*, 48; 167-177.
- Todorov, S.D. and Dicks, L.M.T. 2005. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme Microb Technol.*, 36; 318-326.
- Todorov, S.D., Botes, M., Danova, S.T. and Dicks, L.M.T. 2007. Probiotic properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* HV219, isolated from human vaginal secretions. *J. Appl. Microbiol.* 103; 629-639.

- Tuomola, E.M., Ouwehand, A.C., Salminen, S.J. 1999. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 26; 137-142.
- Tuomola, E.M., Salminen, S.J. 1998. Adhesion of some probiotic and dairy lactobacillus strains to Caco-2 cell cultures, *International Journal of Food Microbiology*, 41; 45-51
- van Niel, E.W.J., Hofvendahl, K. and Hahn-Hagerdal, B. 2002. Formation and conversion of oxygen metabolites by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(9); 4350–4356.
- Vinderola, C.G., Reinheimer, J.A. 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative ‘‘in vitro’’ study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36; 895-904.
- Walther, C., Rossano, A., Thomann, A., Perretan, V. 2008. Antibiotic resistance in *Lactococcus* species from bovine milk: Presence of a mutated multidrug transporter mdt (A) gene in susceptible *Lactococcus garvieae* strains. *Veterinary Microbiology*, 131; 348-357.
- Wang, A.N., Yi, X. W., Yu, H. F., Dong, B., Qiaso, S.Y. 2009. Free radical scavenging activity of *Lactobacillus fermentum* in vitro and its antioxidative effect on growing-finishing pigs. *J. Applied Microbiol.*, 107; 1140-1148
- WHO Expert Committee on Food Additives. 1969. Specifications for the identity and purity of food additives and their toxicological evaluation: some antibiotics. Twelfth Report. WHO Technical Report Series No. 430.
- Williams, A.M., Fryer, J.L., Collins, M.D., 1990. *Lactococcus piscium* sp. nov. a new *Lactococcus* species from salmonid fish. *FEMS Microbiology Letters*, 68; 109–114.
- Wirawan, R.E., Klesse, N.A., Jack, R.W., Tagg, J.R. 2006. Molecular and genetic characterization of a novel Nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72; 1148-1156.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Dilek KAYA ÖZDOĞAN

Doğum Yeri : Giresun

Doğum Tarihi : 01.02.1981

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Giresun Hamdi Bozbağ Anadolu Lisesi (1991-1998)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
(1998-2002)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Alan
Öğretmenliği Tezsiz Yüksek Lisans Programı(2002-2003)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim
Dalı (Şubat 2009-Ocak 2011)

Çalıştığı Kurumlar

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Kocaeli İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü 2005-2008

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Toprak Gübre ve Su Kaynakları Merkez Araştırma
Enstitüsü Müdürlüğü 2008-