

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
2021-YL-088

**GELENEKSEL PEYNİRLERDEN İZOLE EDİLMİŞ LAKTİK
ASİT BAKTERİLERİNİN BAZI PROBİYOTİK
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE BEYAZ PEYNİR
ÜRETİMİNDE KULLANIMI**

**SEVDA TUNAR BAKAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Çisem BULUT ALBAYRAK**

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından MF-21004 proje numarası ile desteklenmiştir

AYDIN – 2021

TEŞEKKÜR

Yüksek lisanseğitimi uzun ve meşakkatli bir yolculuğa çıkmanın ilk basamağı gibidir. Yolun sonunda beni neyin beklediğini ön göremediğim, tam da umutsuzluğa kapıldığım işte o anlarda, ışıklarıyla yolumu aydınlatan tez danışmanım Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği DR. ÖĞR. ÜYESİ Çisem BULUT ALBAYRAK’a ve Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Merkezi Laboratuvar sorumlusu

Öğr.Gör. Mürüvvet ABBAK’a çok teşekkür ederim. Ayrıca, her zaman desteğini esirgemeyen Öğr. Gör. Dr. Mehmet ÇELEBİ’ye, Öğr. Gör. Mustafa DURAN’a ve Arş. Gör. Özlem ERDOĞDU’ya verdikleri akademik bilgilerle bana yardımcı olan Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’ndaki diğer tüm öğretim üyelerine, teşekkürü bir borç bilirim.

Hayallerimi gerçekleştirebilmek için verdiğim bu mücadelede, her türlü zorluğa benimle beraber göğüs geren sevgili aileme ve eşim Mehmet Veysi BAKAN’a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Sevda TUNAR BAKAN

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. Probiyotiklerin Tanımı, Tarihçesi ve Günümüzdeki Durumu.....	3
2.3. Başlıca Probiyotik Mikroorganizmalar	8
2.3.1. Laktik Asit Bakterileri	8
2.3.2. Bifidobakteriler.....	9
2.3.3. Diğerleri.....	10
2.4. Probiyotik Mikroorganizmaların Seçim Kriterleri ve Kaynakları.....	10
2.5. Peynirde Probiyotik Mikroorganizmaların Canlılığını Etkileyen Başlıca Faktörler	17
2.6. Probiyotik Kaynağı Olarak Beyaz Peynir	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM	24
3.1. Materyal.....	24
3.1.1.Peynir Örnekleri	24
3.1.2. Çiğ Süt, Starter Kültür ve Peynir Mayası	24
3.1.3. Kimyasallar.....	25

3.2. Yöntem	25
3.2.1. Peynir Örneklerinin Asitlik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	25
3.2.1.1. Potansiyometrik Yöntem	25
3.2.1.2. Titrasyon Yöntemi.....	25
3.2.3. Geleneksel Peynirlerden LAB İzolasyonu	26
3.2.3.1. İzolasyon ve Saflaştırma.....	26
3.2.3.2. Morfolojik İnceleme ve Ön Tanımlama	27
3.2.3.2.1. Basit Boyama.....	27
3.2.3.2.2. Katalaz Testi	27
3.2.3.3. Gram Boyama.....	28
3.2.4. İzolatların Uzun Süreli Muhafazası.....	28
3.2.5. Aside ve Safra Tuzuna Tolerans Özelliklerine Göre Ön Eleme.....	29
3.2.5.1. İzolatların Aside Toleransı	29
3.2.5.2. İzolatların Safra Tuzuna Toleransı	29
3.3. Başlıca Probiyotik Özelliklerin Değerlendirilmesi.....	30
3.3.1. İzolatların Simüle Mide ve Pankreatik Sularına Toleransı.....	30
3.3.2. Safra Tuzu Hidrolizi	31
3.3.3. Hidrofobisite Testi.....	31
3.3.4. Otoagregasyon Testi	32
3.3.5. Antimikrobiyal Aktivitenin Değerlendirilmesi	32
3.3.6. Antibiyotik Direnci.....	33
3.4. Fizyolojik ve Biyokimyasal Karakterizasyon	33
3.4.1. Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Büyüme Testi	33
3.4.2. Farklı Sıcaklıklarda Büyüme Testi	34
3.4.3. Glikozdan Gaz Oluşturma Testi	34
3.4.4. Arjinin Hidroliz Testi	34

3.4.5. Karbonhidrat Fermentasyon Testi	35
3.5. İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin 16S rRNA ile Tanımlanması.....	35
3.6. Diğer Probiyotik Özellikler	36
3.6.1. HT-29 Hücre Hattına Tutunma.....	36
3.6.2. KLA Üretim Testi.....	37
3.6.3. Ekzopolisakkarit Oluşturma Özelliği.....	37
3.6.4. Kolesterol Asimilasyon	38
3.6.4.1. Kolesterol Stok Solüsyonu ve Deney Ortamının Hazırlanması	38
3.6.4.2. Kolesterol Miktarındaki Azalma Yüzdesinin Tespiti.....	38
3.7. Seçilmiş Suş (S16) İle Beyaz Peynir Üretimi.....	39
3.8. Peynirde Yapılan Analizler	42
3.8.1. pH Tayini.....	42
3.8.2. Toplam Asitlik Tayini	42
3.8.3. Kuru Madde Tayini	42
3.8.4. Yağ Tayini	43
3.8.5. Tuz Tayini	43
3.8.6. Peynirde Mikrobiyolojik Analizler.....	44
4. BULGULAR	45
4.1. Peynir Örneklerinin Kimyasal Özellikleri ve LAB Sayımı.....	45
4.2. LAB Safılaştırma	46
4.3. Gram Boyama ve Katalaz Testi.....	46
4.4. Probiyotik Ön Eleme: pH ve Safra Tuzu Toleransı.....	47
4.5. Başlıca Probiyotik Özellikler	51
4.5.1. İzolatların Simüle Mide ve Pankreatik Sularına Toleransı.....	51
4.5.2. Safra Tuzu Hidrolizi	53
4.5.3. Hidrofobisite Testi.....	54

4.5.4. Otoagregasyon.....	55
4.5.5. Antimikrobiyal Aktivitenin Değerlendirilmesi	56
4.5.6. Antibiyotik Direnci.....	57
4.5.7. Fizyolojik ve Biyokimyasal Karakterizasyon.....	59
4.6. İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin 16S rRNA ile Tanımlanması.....	62
4.7. Diğer Probiyotik Özellikler	64
4.7.1. HT-29 Hücre Hattına Tutunma.....	64
4.7.2. KLA Üretim Testi.....	65
4.7.3. Ekzopolisakkarit Oluşturma Özelliği.....	67
4.7.4. Kolesterol Asimilasyon	68
4.8. Seçilmiş Suş (S16) İle Beyaz Peynir Üretimi.....	69
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	74
KAYNAKLAR.....	76
EKLER	86
Ek 1. Çalışmada kullanılan kimyasallar, besiyerleri ve ürün kodları.....	86
Ek 2. Boyamada kullanılan çözeltilerin içeriği ve hazırlanışı	88
Ek 3. Fizyolojik ve biyokimyasal analizler için modifiye MRS besiyeri içeriği	89
Ek 4. Analizlerde kullanılan reaktif ve tamponlu solüsyon içeri ve hazırlanışı	91
Ek 5. KLA standart solüsyonu hazırlanışı ve eğrisi	92
BİLİMSEL ETİK BEYANI.....	94
ÖZ GEÇMİŞ.....	95

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µg	: Mikrogram
A	: Ağırlık
BM	: Birleşmiş Milletler
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EMP	: Embden-Meyerhof-Parnas
EPS	: Ekzopolisakkarit
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	: Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi
GI	: Gastrointestinal
H	: Hacim
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
IgA	: İmmünoglobulin A
KLA	: Konjuge Linoleik Asit
L	: Litre
LA	: Linoleik Asit
LAB	: Laktik Asit Bakterileri
Mg	: Miligram
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
SCFA	: Kısa zincirli yağ asitleri
SH	: Soxhlet Henkel
WSPE	: Suda çözünür peptit özü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Zaman içerisinde probiyotik kavramını şekillendiren önemli çalışmalar	5
Şekil 2.2. Peynirde probiyotik bakterilerin canlılığını etkileyen ana faktörler	19
Şekil 2.3. Beyaz peynir üretimi akış şeması.....	22
Şekil 3.1. Laboratuvar ölçekli beyaz peynir üretim akış şeması.	41
Şekil 4.1. Manisa keçi (a) ve inek (b) peynir örnekleri.	45
Şekil 4.2. Temsili izolatların MRS Agar besi ortamında çizgi plaka görünümü (SB15 – SB16).	46
Şekil 4.3. a)Temsili izolatın (kok)Gram boyama ile ışık mikroskobu görüntüsü (ST16), b) Temsili izolatın (basil) Gram boyama ile ışık mikroskobu görüntüsü (S17)	47
Şekil 4.4. Temsili (KP 14) izolatın safra tuzu hidrolizi petri görüntüsü.	54
Şekil 4.5. Temsili izolatların <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 patojenine karşı antimikrobiyal aktivitesi(İP2,KP4,İP14,ST16,KP14,İP9,ST17, <i>Lb. acidophilus</i>)....	57
Şekil 4.6. Temsili izolatın (İP14) antibiyotik duyarlılığı (a: Vankomisin, b: Gentamisin, c: Kloramfenikol, d: Eritromisin).	59
Şekil 4.7. Seçili izolatların şeker fermentasyonu.	60
Şekil 4.8. Seçili izolatların HT-29 hattına tutunma özellikleri.....	63
Şekil 4.9.Temsili izolatın (S16) HT-29 hücrelerine tutunması ve giemsa boyası ile ters mikroskopta(Olympus CK40) görüntüsü a) (S16) ve HT-29 hücreleri b) Sadece HT-29 hücreleri.	65
Şekil 4.10. Seçili izolatların KLA üretme özellikleri (µg/ml).....	66
Şekil 4.11. Seçili izolatların EPS üretimleri (g/L).....	67
Şekil 4.12. Seçili izolatların Kolestrol azaltıcı/uzaklaştırma yüzdesi.	69
Şekil 4.13. Laboratuvar ölçekli beyaz peynir üretimine ilişkin görseller.	70

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Probiyotikler için öne sürülen etki mekanizmaları	7
Çizelge 2.2. Probiyotik peynir üretiminde kullanılan bakterilerin türleri/alt türleri	8
Çizelge 2.3. Geleneksel peynirlerin probiyotik mikroorganizma potansiyeli.....	12
Çizelge 2.4. Probiyotik mikroorganizma izolasyonu için seçilmiş çalışmalar.....	20
Çizelge 3.1. Peynir örnekleri ve özellikleri.....	24
Çizelge 3.2. İnek sütü örneklerinin kimyasal özellikleri.....	25
Çizelge 4.1. Peynir örneklerinin asit özellikleri ve LAB flora yükü.....	45
Çizelge 4.2. İzolatların mide asidine toleransı (pH 2,5).....	48
Çizelge 4.3. İzolatların safra tuzuna toleransı.	50
Çizelge 4.4. Seçili izolatların simüle mide bağırsak ortamında canlılığı.....	53
Çizelge 4.5. Seçili izolatların safra tuzu hidrolize etme özellikleri.....	54
Çizelge 4.6. Seçili izolatların hücre yüzey hidrofobisite özellikleri.	55
Çizelge 4.7. Seçili izolatların otoaggregasyon yüzdeleri.	55
Çizelge 4.8. Seçili izolatların antimikrobiyal özellikleri (mm).....	57
Çizelge 4.9. Seçili izolatların antibiyotik direnci	58
Çizelge 4.10. Fizyolojik ve biyokimyasal karakterizasyon.....	61
Çizelge 4.11. İzolatların 16S rRNA ile tanımlanması.....	63
Çizelge 4.12. KLA kons. (µg/ml) ve 233 nm'de absorbans değerleri.	66
Çizelge 4.13. Seçili izolatların EPS üretimleri (g/L).	67
Çizelge 4.14. Seçili izolatların kolesterol azaltıcı/uzaklaştırma yüzdesi.	68
Çizelge 4.15. Seçilmiş izolat (S16) ile üretilen beyaz peynirin kimyasal analizleri.	71
Çizelge 4.16. Seçilmiş izolat (S16) ile üretilen beyaz peynirin mikrobiyolojik analizleri.	73

ÖZET

GELENEKSEL PEYNİRLERDEN İZOLE EDİLMİŞ LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BAZI PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE BEYAZ PEYNİR ÜRETİMİNDE KULLANIMI

Tunar Bakan S. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Programı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2021

Amaç: Probiyotikler, belirli miktarlarda tüketildiğinde konakçı sağlığı üzerinde olumlu etkilere neden olan mikrobiyel gıda katkılarıdır. Son yıllarda geleneksel fermente gıdaların florasında bulunan mikroorganizmaların probiyotik potansiyeli önem kazanmıştır. Bu tez çalışmasında, geleneksel yöntemlerle üretilmiş beyaz peynir örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve probiyotik özelliklerinin araştırılması hedeflenmiştir. Ayrıca istenilen probiyotik özelliklere sahip izolat ile beyaz peynir üretimi planlanmıştır.

Materyal ve Yöntem: Laktik asit bakterisi izolasyonu için, çiğ süt ile üretilmiş yedi adet beyaz peynir örneği kullanılmıştır. Sonrasında saflaştırılmış izolatların başlıca probiyotik özellikleri (aside ve safra tuzuna tolerans) belirlenmiştir. Ardından, seçilen dirençli 15 izolat için simüle mide bağırsak ortamında canlılık, antimikrobiyal özellik, antibiyotik direnç, adezyon özellikleri tespit edilmiştir. Seçilen 5 izolat için diğer probiyotik kriterlerden konjuge linoleik asit üretimi, ekzopolisakkarit üretimi, kolesterol azaltıcı etki ve bağırsak hücrelerine tutunma özellikleri de incelenmiştir. Yüksek canlılık, hidrofobisite, antimikrobiyal özelliğe sahip seçili izolat ile beyaz peynir üretimleri gerçekleştirilmiş, mikrobiyolojik ve kimyasal özellikleri belirlenmiştir.

Bulgular: Çalışmanın sonunda, 64 izolat saflaştırılmış ve laktik asit bakterisi olarak ön tanımlaması yapılmıştır. İzolatlar büyük oranda safra tuzuna tolerans göstermiştir. Ancak mide asidinde (pH 2,5) önemli ölçüde canlılık kaybı gözlemlenmiştir. 15 adet izolat en iyi asit ve safra tuzu toleransı göstermiştir. Bu izolatların çoğu (14/15), simüle mide bağırsak geçişi sonrasında 10^6 kob/ml üzerinde canlılık ile istenilen probiyotik kriterini sağlamıştır. İzolatların tümü % 4 ve % 6,5 tuzkonsantrasyonlarında 15 °C ve 45 °C sıcaklıklarda ve pH

9,6'da iyi büyüme özellikleri göstermiştir. Değişen düzeylerde otoaggregasyon (%85,8- %1,71), ve yüzey hidrofobisite (%0,64-35,55) özellikleri belirlenmiştir. Patojenler içerisinde en fazla *Listeria monocytogenes* bakterisi inhibe edilmiştir. S16 kodlu izolatın ticari peynir kültür ile birlikte kullanıldığı beyaz peynir üretiminde, kontrole göre probiyotik peynirin kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinin önemli düzeyde değişiklik göstermediği bulgulanmıştır.

Sonuç: Fermente süt ürünü olan geleneksel yöntemle üretilmiş beyaz peynir probiyotik potansiyeli yüksek laktik asit bakterileri içermektedir. Başlıca probiyotik özelliklerin yanı sıra farklı fonksiyonları(konjuge linoelik asit üretme, kolesterol azaltıcı, vb.) ile öne çıkan izolatlar ileride endüstriyel probiyotik peynir ve süt ürünlerinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Probiyotik, Beyaz peynir, Laktik asit bakterisi, Antimikrobiyal.

ABSTRACT

DETERMINATION OF SOME PROBIOTIC PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM TRADITIONAL CHEESES AND UTILIZATION IN WHITE CHEESE PRODUCTION

Tunar Bakan S. Aydin Adnan Menderes University, Graduate School Of Natural And Applied Sciences, Food Engineering Program, Master's Thesis, Aydın, 2021

Objective: Probiotics are microbial food supplements that cause positive effects on host health when consumed in certain amounts. In recent years, the probiotic potential of microorganisms in the flora of traditional fermented foods has gained importance. In this thesis, it was aimed to isolate lactic acid bacteria from white cheese samples produced by traditional methods and to investigate their probiotic properties. In addition, it was planned to produce white cheese with the isolate having the desired probiotic properties.

Materials and Methods: Seven white cheese samples produced with raw milk were used for the isolation of lactic acid bacteria. Afterwards, the main probiotic properties (acid and bile salt tolerance) of the purified isolates were determined. Then, viability in the simulated gastrointestinal environment, antimicrobial properties, antibiotic resistance and adhesion properties were determined for 15 selected resistant isolates. Conjugated linoleic acid production, exopolysaccharide production, cholesterol-reducing effect and adhesion to intestinal cells were also investigated for the 5 selected isolates. Lab-scale white cheese production was performed with isolate selected by several probiotic criteria (high viability, hydrophobicity, antimicrobial properties). Then, microbiological and chemical properties of the cheese were determined.

Results: At the end of the study, 64 isolates were purified and pre-identified as lactic acid bacteria. The isolates were largely bile salt tolerant. However, significant loss of viability was observed in gastric acid (pH 2,5). 15 isolates showed the best acid and bile salt tolerance. Most of these isolates (14/15) met the desired probiotic criteria of viability above 10^6 cfu/ml after simulated gastrointestinal transit. All of the isolates showed good growth

characteristics at 4% and 6.5% salt concentrations at temperatures of 15 °C and 45 °C and pH 9,6. Variable degrees of auto-aggregation (85.8%-1.71%), and surface hydrophobicity (0,64-35,55%) were determined. *Listeria monocytogenes* was the most inhibited among pathogens. It was found that the chemical and microbiological properties of probiotic cheese produced by commercial cheese starter and probiotic culture (S16) were not significantly changed compared to the control.

Conclusion: Traditionally produced white cheese, which is a fermented milk product, contained lactic acid bacteria with high probiotic potential. It was concluded that the isolates, which stand out with their different functions (producing conjugated linoelic acid, reducing cholesterol, etc.) in addition to their main probiotic properties, can be used in industrial probiotic cheese and dairy products in the future.

Keywords: Probiotic, White cheese, Lactic acid bacterium, Antimicrobial.

1. GİRİŞ

Probiyotik kültürler, doğal bağırsak mikroforasını olumlu yönde değiştirerek insan ve hayvan sağlığı üzerinde yararlı etkiler bırakan tek veya karışık kültürler olarak bilinmektedir. Gastrointestinal mukozada mevcut olan tüm koruyucu mekanizmalara rağmen insanlar, zaman zaman bakteri ve virüsleri de içeren enterik patojenlere maruz kalmaktadırlar. Gastrointestinal sistem kompleks mikroorganizma topluluğuna sahip olup, sistemde mikroorganizma dağılımı da farklılık göstermektedir (Neish, 2002; Montalto vd., 2009). Özellikle, bağırsakta bulunan mikroorganizmalar konakçıyla etkileşime girerek, patojenler tarafından kolonileşmeyi önleme, besinsel bileşikler parçalama, besin maddeleri üretme ve normal mukoza bağışıklığını geliştirme ve sürdürme gibi çeşitli işlevlere katkıda bulunurlar. Mide asiditesi, etkili bağırsak motilitesi, bağırsak proteolitik enzimleriyle bakterilerin tahrip edilmesi, bağırsakta üretilen immünoglobulin A (IgA)'nın geniş salınımı gibi mekanizmalar ile etkili bir bağışıklık sistemi sayesinde bakteri-konakçı dengesi sağlanmaktadır. Bu kontrol mekanizmaları değiştiğinde, kommensal bakteri sayısı düşerek patojen özellikler gösteren bakteri sayısında artış olabilir, bu da bağırsak hastalıklarının başlangıcı ve ilerlemesi ile sonuçlanmaktadır (Flore ve Santoliquido, 2009). Zaman içerisinde pek çok bilimsel çalışmada, probiyotik mikroorganizmaların bağırsak florasını dengelemesi ve bağırsak sağlığına çok çeşitli sağlık faydalarının olduğu bildirilmiştir (Romário vd., 2020). Günümüzde, sadece gıda alanında değil tıp alanında, veterinerlik, eczacılık, vb. alanlarda probiyotiklerin araştırılması ve kullanılması önem kazanmıştır. Gıda alanında yoğurt, süt gibi süt ürünleri ilk uygulanan probiyotik gıdalar olmuştur. Bu ürünlerde kullanılan probiyotik mikroorganizmalar başlıca *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsine ait bakteriler olup daha çok insan kaynaklı olduğu gözlemlenmiştir (Uymaz, 2010).

Son yıllarda, fermente süt ürünlerinin üretiminde, farklı kaynaklardan izole edilmiş ve farklı sağlık etkilerine sahip probiyotik özellikli LAB'nin araştırılması önem kazanmaktadır. Endüstride sınırlı sayı ve tipte probiyotik bakteri kullanımı bilinmekte ve bu nedenle geleneksel fermente gıdaların farklı probiyotik bakterilerin seçilmesi için uygun kaynaklar olduğu düşünülmektedir. Ayrıca fermente gıdalardan elde edilen probiyotik özellikli bakterilerin gıda üretim proseslerine ve gıda ortamına daha iyi uyum sağlayabileceği önemli avantaj oluşturabilir. Süt ve süt ürünleri, yine benzer kaynaklardan elde edilmiş yeni

probiyotik bakterilerin bağırsak sistemine taşınması için uygun ortam sayılabilen gıda maddeleridir. Yoğurt ve peynir gibi süt ürünleri probiyotik kültürlerin canlılığının ve/veya gelişiminin desteklenmesinde pozitif rol oynayabilmektedir.

Gastrointestinal sistemde enterik patojenler, sistemde var olan bakteri popülasyonunun üstünde bir yoğunlukta nüfuz ederek enfeksiyon oluştururlar (Sekirov vd., 2021). Bu nedenle probiyotik özellik gösteren bakterilerin bağırsak mukozasına tutunabilmesi ve kolonize olabilmesi önem taşımaktadır. Dolayısı ile probiyotik mikroorganizma seçimi yapılırken bağırsaklara tutunma yeteneği yüksek olan mikroorganizmalar tercih edilmektedir (Rinkinen vd., 2003;Muñoz-quezada vd., 2012).

Probiyotik süt ürünleri içerisinde yoğurt, kefir ve süt temelli gıda ürünleri probiyotik gıda üretiminde ilk yıllardan beri en fazla uygulama alanı bulmuştur. Ancak,dondurma, peynir çeşitleri gibi farklı süt ürünleri için de artan toplumsal ve bilimsel ilgi olduğu görülmektedir. Dünyada ve ülkemizde çok çeşitli peynir üretimi olmakla birlikte bu peynirlerin probiyotik ürün geliştirilmesi için kullanımı konusu da önem kazanmaya devam etmektedir. Beyaz peynir ülkemizde geleneksel ve endüstriyel yöntemlerle üretilen ve sıklıkla tüketilen ekonomik değeri en yüksek peynir çeşitlerinden biridir. Probiyotik beyaz peynir üretimi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma olmakla birlikte bu peynirlerde kullanılan probiyotik suşların insan kaynaklı olduğu bilinmektedir.Ülkemizde ve dünyada probiyotik özellik gösteren suşların seçimi ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmaktadır (Bao vd., 2010;Ehsani vd., 2018;Terpou vd., 2018;Ruiz-moyano vd., 2019;Margalho vd., 2021).

Bu tez çalışmasının amacı, çiğ süt kullanılarak geleneksel yöntemlerle üretilen beyaz peynirlerden izole edilen LAB'nin *vitro* koşullarda başlıca probiyotik özellikleri yanı sıra KLA üretimi, kolestrol azaltma gibi diğer farklı probiyotik özelliklerin araştırılması ile beyaz peynir üretiminde kullanım potansiyelinin değerlendirilmesidir. Böylece, farklı amaçlarla spesifik probiyotik kültürlerinin beyaz peynir üretimi için dizayn edilmesi ön görülmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1.Probiyotiklerin Tanımı, Tarihçesi ve Günümüzdeki Durumu

Probiyotik terimi Latince “pro” ve “bios” köklerinden türetilmiştir ve “canlı için” anlamı taşımaktadır. Zaman içerisinde araştırmacılar tarafından probiyotikler farklı şekilde tanımlanmışlardır (Toole vd., 2017).

Probiyotikler ile ilgili olarak ilk çalışmalar 19 y.y’da başlamaktadır. Nobel ödüllü Rus bilim adamı Ellie Metchnikoff o zamanlar *Bulgarianbacillus* olarak bilinen yoğurt bakterisinin sağlık üzerine olumlu etkileri olduğunu iddia etmesi bu konunun şekillenmesinde önemli bir rol oynamıştır. Ellie Metchnikoff (1907), Bulgar köylülerinin uzun, sağlıklı yaşamlarının fermente süt ürünleri tüketmelerinin bir sonucu olduğunu öne sürmüş ve daha sonra yoğurdun, bağırsağı diğer bakterilerin zararlı etkilerinden korumak için gerekli organizmaları içerdiğini savunmuştur(Ashraf ve Shah, 2011). Probiyotik terimi Lilley ve Stillwell tarafından “Bir protozoa tarafından sentezlenen, bir diğer protozoanın gelişimini teşvik eden bileşikler”olarak ilk 1965 yılında tanımlanmıştır (Toolevd., 2020).Shirota daha sonraki yıllarda *Lactobacillus casei* izolatu ile probiyotik fermente sütü ticarileştirmiştir(Ashrafve Shah, 2011). Fuller (1989), probiyotikleri “konakçı hayvanın bağırsak mikrobiyal dengesini geliştirerek faydalı bir şekilde etkileyen canlı mikrobiyal besin takviyesi” olarak tanımlamıştır(Mohammed ve Çön., 2021). DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) ve BM'nin (Birleşmiş Milletler), FAO (Gıda ve Tarım Örgütü) tarafından geliştirilen en yaygın kullanılan tanım, “probiyotikler, yeterli miktarda tüketildiğinde sağlığa yararlı olan canlı mikroorganizmalardır” şeklindedir(WHO, 2002).

Günümüzde ise yapılan bilimsel çalışmalar ve belirlenen yeni kullanım alanlarıyla probiyotikler, “kalitatif ya da kantitatif olarak bağırsak yapısını etkileyen veya immun sistemini değiştirerek olumlu etkiler gösteren, insan ve hayvanlar tarafından tüketilen canlı mikroorganizma preparatları” olarak tanımlanmaktadır (Alp, 2018).

Probiyotik bakteriler canlılar için;

- i. Patojenik özellik göstermemeli,
- ii. Toksin üretmemeli,

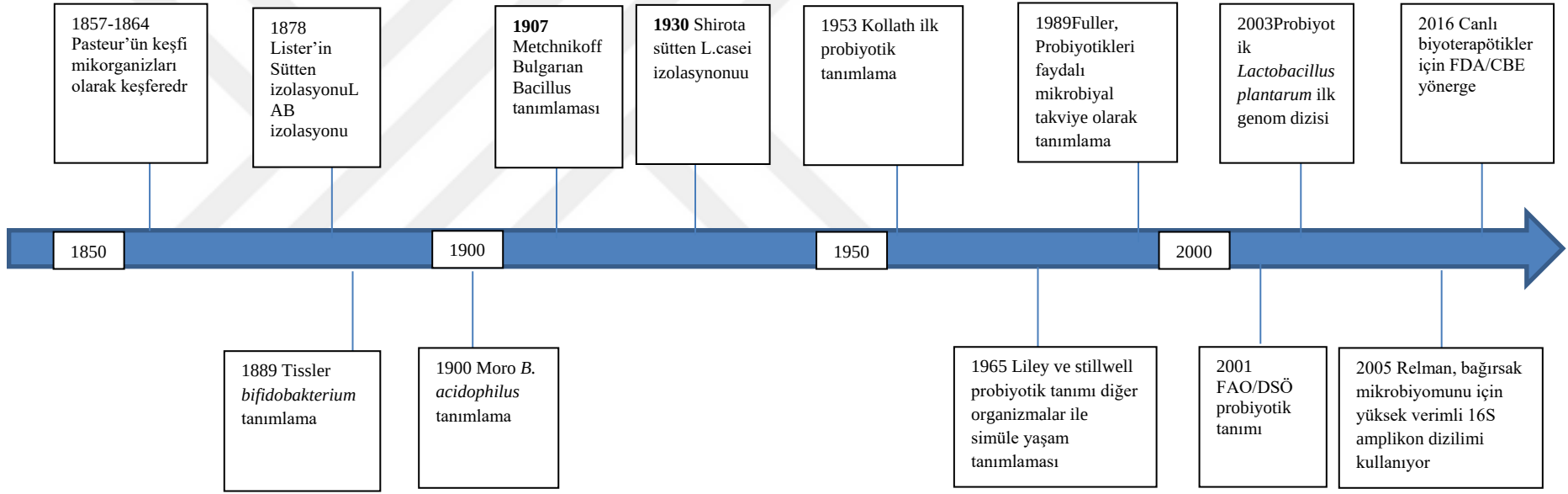
iii. Aktarılabılır antibiyotik direnç genleri içermemeli,

iv. Düşük pH ve safra tuzlarından etkilenmeden bağırsak hücrelerine tutunabilmeli,

v. Kolonize ve metabolize olabilmeli,

üretim ve depolama sırasında canlılığını ve aktivitesini koruyabilmelidir (Ruiz-Moyano vd. 2019; Toole vd., 2020)





Şekil 2.1. Zaman içerisinde probiyotik kavramını şekillendiren önemli çalışmalar (Toole vd., 2020).

Probiyotiklerin Sağlık Etkileri

Son yıllarda farklı araştırmalarda probiyotiklerin insanlar ve hayvanlar için sağlıklı beslenmenin yanı sıra doğal, güvenli ve mikrobiyal enfeksiyonlara karşı koruyucu bir bariyer sağlamanın yolu olarak önemini desteklemektedir (Demir vd., 2019; Kalkan, 2020). Probiyotiklerin farklı sağlık etkileri üzerindeki etki mekanizmaları Çizelge 2.1 sunulmuştur. Artan bilimsel çalışmalar ve bilinçli tüketicinin ilgisiz canlı organizmaların sağlık üzerindeki etkileri ve tedavisindeki rolüne yönelmiştir. Bilinçli tüketiciler, “iyi” veya “yararlı” bakteri terimine ve bunların çeşitli hastalıkların tedavisinde veya önlenmesinde faydalı olabileceğine daha olumlu yaklaşmaktadır (Rolim vd., 2020).

Probiyotikler yeterli miktarlarda ($>6 \log \text{ cfu/g}$) tüketildiğinde konakçıya olumlu sağlık etkileri sağlayabilen canlı mikroorganizmalar olarak kabul edilir. (WHO, 2002). Bazı araştırmalar, belirli bakteri suşlarının yüksek popülasyon oranlarında besinlerdeki bozulmayı, patojenik bakterilere antagonizma ile veya bakteriyosin üretimiyle azaltılabilirliğini desteklemektedir (Woraprayote vd., 2016; Ullah vd., 2017). Probiyotiklerin varlığı birçok sağlık yararı ile ilişkilidir. Günümüzde, çoğu probiyotik bakteri türleri *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsileri olarak bilinmektedir (Prasad vd., 2000) Probiyotikleri karakterize etmek için kullanılan fonksiyonel özelliklerden biri kolesterol azaltma etkileri ile ilgilidir. (Park vd., 2007; Xie vd., 2015). Antimikrobiyal etkileri ile ilişkili de pek çok sağlık faydası patojenlerin engellenmesi ile sağlanabilir. Probiyotiklerin patojenler üzerine etki mekanizmasında örneğin; laktik asit, asetik asit, hidrojen peroksit ve bakteriyosinler gibi antimikrobiyal bileşikler rol oynamaktadır.

Probiyotiklerin insan sağlığı açısından sağladığı faydalar şu şekilde sıralanabilir;

- Gıdalarla alınan toksik maddelerin vücuttan atılması,
- Kabızlık sorununun ve ağız kokusu sorununun giderilmesi,
- Bağırsaklardaki zararlı bakterileri kontrol altına alıp, bağışıklık sistemini güçlendirerek direncinin artması,
- Antibiyotik kullanımı nedeniyle doğal florası bozulan bağırsak dengesinin düzeltilmesi,
- B grubu ve K vitamini üretimi ve emilimi,
- Kalsiyumun bağırsaklardan emilimini artırıp; kemik erimesinin (osteoporoz) önlenmesi,

- Zararlı bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların yavaşlatılması,
- Vajinal florayı dengede tutarak, vajinal enfeksiyonlara sebep olan patojen mikroorganizmaların (*Candida*) gelişimini baskılanması,
- İdrar yolu enfeksiyonlarına ve seyahatlerde ishale sebep olan *E.coli* bakterisinin gelişiminin engellemesi,
- Alerji belirtilerinin azaltılması,
- Cildin görünümünün iyileşmesi,
- Sindirim kanalında bazı gerekli enzimleri üreterek sindirime katkıda bulunurlar. Laktoz ve protein sindirimini kolaylaştırmada etkilidirler (Gomes vd., 2009).

Çizelge 2.1. Probiyotikler için öne sürülen etki mekanizmaları(Doğan, 2011;Sameer vd. 2020)

Sağlığa Olan Faydalı Alanlar	Öne Sürülen Mekanizma(lar)
Laktoz intoleransının indirgenmesi Barsak florasına olumlu etkisi	Bakteriyal galaktosidazın laktoz üzerine etki etmesi Toksik metabolit üretiminin azaltılması yoluyla, aşırı gelişmiş olan floranın aktivitesinin etkilenmesi Antibakteriyal özellikler
İntestinal enfeksiyonlarının engellenmesi	Sistemik ve yasalgalısal immün cevap simülasyonu Barsak koşullarının patojenlerin gelişmesine imkan vermeyecek şekilde değiştirilmesi(pH,kısa zincirli yağ asitleri, bakteriyosinler) Aggregasyon ve koaggregasyon yetenekleri İntestinal mukozaya yapışmak suretiyle patojenlerin yapışmasının engellenmesi Besinler için rekabet
İmmün sistemin güçlendirilmesi	Beyaz kan hücrelerinin fagositik aktivitelerinin artırılması IgA üretiminin artırılması İnta-epitel lenfositlerinin çoğaltılması
İltihabi ve alerjik reaksiyonların azaltılması	Bağırsıklık sisteminin dengesinin yeniden düzenlenmesi Sitokin sentezinin düzenlenmesi
Kolon kanseri riskinin azaltılması	Mutajen bağlama Karsinojenlerin inaktif hale getirilmesi
Ürogenital enfeksiyonlar	Ürinal ve vajinal kanal hücrelerine yapışma İnhibitör maddelerin üretimi (H ₂ O ₂ gibi)
<i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonu	Laktik asit üretimi <i>H.pylori</i> üreaz aktivitesinin azaltılması
Kan lipidlerinin düşürülmesi ve kalp hastalığı riskinin azaltılması	Kolestrol asimilasyon Safra tuzu hidrolaz enzim aktvitesi

2.3.Başlıca Probiyotik Mikroorganizmalar

Probiyotik gıdaların üretiminde kullanılan mikroorganizmalar başlıca *Lactobacillus* cinsine ait olmakla birlikte *Enterococcus*, *Leuconostoc* gibi diğer laktik asit bakterisi türleri de probiyotik süt ürünlerinde kullanılmış olduğu bilinmektedir. (Çizelge 2.2)

Çizelge 2.2. Probiyotik peynir üretiminde kullanılan bakterilerin türleri/alt türleri (Mortazavian ve Cruz, 2011)

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Diğerleri (*)
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>E. faecium</i>
<i>L. casei</i> ssp. <i>pseudopantarum</i>	<i>B. breve</i>	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>
<i>L. casei</i> ssp. <i>rhannosus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. gasseri</i>		
<i>L. paracasei</i>		
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. rhannosus</i>		
<i>L. salivarius</i>		

(*)Aday suşlar veya probiyotikler olarak olası potansiyel kullanım.

P = Propionibakteri.

2.3.1. Laktik Asit Bakterileri

Fermentasyon, özellikle laktik asit fermentasyonu çok eski bir uygulama olup, fermentasyonun mikrobiyal doğası ilk olarak 1857'de Louis Pasteur tarafından ortaya çıkarılmıştır(Toole vd., 2020). Günümüzde probiyotik olarak tanımlanan mikroorganizmaların büyük bir bölümünü oluşturan LAB fermentasyonda önemli rol oynamaktadır. LAB; Gram pozitif, hareketsiz, spor oluşturmeyen, basil ve kok şeklinde, katalaz negatif, aerotolerant, aside dayanıklı nitrati indirgemeyen, karbonhidratları ve yüksek alkollerini fermente ederek başlıca son ürün olarak laktik asit üreten bir gruptur. İnsanlar, hayvanların gastrointestinal (GI) sistemleri ve gıdalar gibi geniş bir ekolojik alanda doğal olarak bulunmaktadır ve heterojen bir mikroorganizma grubunu temsil ederler. Doğal ortamları; süt ve süt ürünleri, fermente gıdalar, taze veya çürümüş

bitkiler, insan ve hayvan bağırsak mukoza içerikleridir. Gıda üretiminde önemli teknolojik özellikleri yanında konakçı için yararlı sağlık etkileri de önemli bir husustur.

LAB çeşitli cinslerden oluşur ve fermentasyon son ürünlerine göre gruplandırılır. Homofermenterler, Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) yolu aracılığıyla homolaktik fermentasyon kullanırlar. Laktik asit, homolaktik fermentasyon için ana son üründür. Laktik asidin yanı sıra karbondioksit, etanol ve asetik asit üreten LAB'ne heterofermenter denir. Bunlar pentoz-monofosfat yolunu kullanırlar. Sadece homofermentatif LAB, glikozu laktik aside hidrolize eden anahtar enzim aldolaza sahiptir(Reis vd., 2012).

Fenotip özelliklerine göre: Obligat homofermentatif, fakültatif heterofermentatif ve obligat olarak gruplandırılırlar. Probiyotik olarak seçilecek LAB'nin yan etkileri az, antibiyotiklere duyarlı olması, mikroflora içinde kolay tanımlanabilmesi, stabil bir suş olması, fajlara dirençli olması, ürün içinde canlı kalabilmesi, oksijene dirençli olması, liyofilize preperat haline getirilebilmesi istenilen özelliklerdendir. Klinik etkinliğin belirlenmiş olması, immün sistemin düzenlenmesi, patojenlerin tutunmasının önlenmesi ve yarışma yoluyla uzaklaştırılması, geçici kolonizasyon sağlanması için mukoza yüzeyine tutunabilmeleri diğer önemli özelliklerdendir. Asit, pH ve safra tuzlarına dirençli olmalıdırlar. Antimikrobiyal maddeler üretebilmelidir. Gastrointestinal sistemde geçici olarak kolonize olabilmelidir. Doğal floraya adapte olabilmeli ve normal mikroflorayı bozmadan patojen bakterileri etkilemelidir (Reis vd., 2012 ; Bosch vd., 2014).

2.3.2. Bifidobakteriler

Lactobacillus ile birlikte *Bifidobacterium* suşları da süt ve süt ürünlerinin formülasyonlarında sağlığı teşvik eden ve gelecek vadeden olarak görülmektedir(Renes vd., 2017).Bifidobakteriler tiamin, riboflavin, B6 vitamini ve K vitamini ve folik asit, niasin ve piridoksin gibi vitamin ve biyoaktif molekülleri sentezleyebilir. Bifidobakterileri içeren fermente süt ürünleri, serbest aminoasitler ve vitaminler açısından zengindir. LAB, bifidobakteriyle kıyaslandığında, ürettikleri L(+)-laktik asit ile insanlar tarafından daha kolay metabolize edilebilen, metabolik asidozlu kişilerde ve bebeklerde daha büyük öneme sahiptir. Bifidobakteri içeren gıda ürünleri minerallerin iyonlaşmasını kolaylaştırarak biyoyararlanımı artırabilmektedir (Mishra vd., 2005).*Bifidobacterium* içeren probiyotik formülasyonları, diğer probiyotik bakteri suşları ile kombinasyon halinde, tek bakteri suşu

olarak, kapsüllenmiş bakteri hücreleri ve prebiyotiklerle birlikte kapsüllenmiş bakteriler olarak formüle edilebilirler. İnsan bağırsağında kolonize olabilen *B. animalis*, *B.adolesanis*, *B.bifidum*, *B.breve*, *B.infantis* ve *B.longum* gibi türlerin probiyotik formülasyonlarda kullanıldığı görülmektedir(Callaghan ve Sinderen, 2016).

2.3.3. Diğerleri

Spor oluşturan bazı *Bacillus* ve *Clostridium* türlerinin probiyotik suşları olumsuz çevre koşulları dayanıklı olmasıyla da probiyotik kullanımda tercih edilmektedir. Ayrıca, son yıllarda probiyotik özellikli maya ve küfler ile ilgili çalışmaların da arttığı görülmektedir(Albayrak ve Duran, 2021b).

2.4.Probiyotik Mikroorganizmaların Seçim Kriterleri ve Kaynakları

Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalarda aranan özellikler, yıllar içerisinde değişiklik göstermiş olmakla birlikte aşağıda başlıca nitelikler sıralanmıştır. Örneğin ilk yıllarda probiyotiklerin insan kaynaklı olması önemli bir tercih sebebi iken günümüzde çeşitli geleneksel fermente gıdalarda kaynak olarak önerilmektedir. Yine mide asidine ve safra tuzuna tolerans önemli bir nitelik olmasıyla birlikte mikroenkapsülasyon gıda uygulamaları bu kriterin önemini azaltmaktadır. Ayrıca farklı sağlık etkileri hedeflenerek spesifik probiyotik kriterleri oluşturulabilir. Aşağıda yaygın probiyotik kriterleri sıralanmıştır;

- Güvenilir olmalıdır, kullanıldığı insan ve hayvanda yan etki oluşturmamalıdır (Reis vd., 2012).
- Stabil olmalıdır; bağırsakta düşük pH, safra tuzları gibi olumsuz çevre koşullarına dirençli olmalıdır.
- Bağırsak hücrelerine tutunabilmeli ve kolonize olabilmelidir.
- Karsinojenik ve patojenik bakterilere antagonist etkili olmalıdır.
- Antimikrobiyal maddeler üretmelidir,

- Konakta hastalıklara direnç artışı gibi yararlı etkiler oluşturma yeteneğinde olmalıdır.
- Bağışıklık sistemini iyileştirmelidir,
- Antibiyotiklere dirençli olmalıdır; antibiyotiğe bağlı diyare gelişen hastalarda bağırsak florasını düzeltmek amacıyla kullanılabileceğinden, bağırsaktaki antibiyotiklerden etkilenmemelidir.
- Minimum etkin dozları bilinmediğinden canlı hücrelerde büyük miktarlarda bulunabilmelidir.
- Endüstriyel işlemlere uygun olmalı, saklama koşullarında uzun süre canlı ve stabil kalabilmelidir.

Probiyotik seçiminde önemli olan bu özelliklerin göz önünde bulundurulduğu peynir kaynaklı çok yakın zamanlı çalışmalar aşağıdaki çizelgede sunulmuştur.(Çizelge 2.3)

Çizelge 2.3.Geleneksel peynirlerin probiyotik mikroorganizma potansiyeli.

ProbiyotikMikroorganizma	Peynir Çeşidi	Peynir Çeşidinin Kaynağı	Başlıca Bulgular	Referans
<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. acidipiscis</i>	Olgunlaşmış Tropikal Meksika Peyniri	Meksika	Bütün suşlarda yüksek hidrofilik karakter Değişen düzeylerde müşine yapışma Düşük moleküler ağırlıklı protein yapısındaki antimikrobiyal madde varlığı	(Rivera-espinoza ve Melgar-Lalanne, 2013)
<i>Lactobacillus casei</i> SJRP35, <i>Leuconostoc citreum</i> SJRP44, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> SJRP57, <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> SJRP58	Mozerella Peyniri	İtalya	Simüle sindirim ortamında yüksek canlılık Yüksek hidrofobisite ve aggregasyon Çoğu β -galaktosidaz enzimine sahip Ticari ilaçlara karşı dirençlilik Bazı antibiyotiklere düşük direnç göstermesi SJRP57 en iyi probiyotik adayı ve virülens faktörleri içermemiş olması	(Beatriz vd., 2014)
<i>Enterococcus faecium</i> (58), <i>Enterococcus hirae</i> , (16) <i>Lactococcus lactis</i> , (5) <i>Lactobacillus plantarum</i> (3), <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> ve <i>Enterococcus hirae</i>	Geleneksel İran Peyniri	İran	Tüm izolatlar aside dirençli <i>E. faecium</i> DC67 haricinde safra tuzuna tolerans 25 -55 % kolesterol düşürücü etki	(Ghahremani ve Mardani, 2015)
<i>L. paracasei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917	Xinjiang Peyniri	Çin	Düşük pH dirençlilik İyi safra tuzu tolerans Değişen düzeylerde antimikrobiyal aktivite <i>L. rhamnosus</i> R4en yüksek hidrofobisite ve otoaggregasyon Yüksek antioksidan özellik İn vivo çalışmada kontrole göre uzamış yaşam süresi <i>L. paracasei</i> K5 istenilen probiyotik özelliklere sahip olduğu ve ticari probiyotik <i>L. plantarum</i> 14917 daha iyi olduğu Değişen düzeylerde antibiyotik direnci Nar suyunda starter olarak kullanımında uygun teknolojik özellikler	(Azatvd., 2016)
<i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus agilis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus Salivarius</i> <i>L. plantarum</i> .	Feta Tipi Peyniri	İran	<i>Lactobacillus plantarum</i> 4 patojen bakteriye karşı inhibitör etkisi Güçlü antimikrobiyal aktivite ve probiyotik özellik <i>E.coli</i> ’ ye karşı inhibitör etki göstermemesi	(Plessas vd., 2017) (Jabbarivd., 2017)

Çizelge 2.3.Geleneksel peynirlerin probiyotik mikroorganizma potansiyeli (Devamı).

Probiyotik Mikroorganizma	Peynir Çeşidi	Peynir Çeşidinin Kaynağı	Başlıca Bulgular	Referans
<i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus fermentum</i>	Mozarella Peyniri	Brezilya	Tüm suşlar yüksek otoaggregasyon Bazı suşlar düşük koaggregasyon ve hidrofobisite değerleri 7 <i>Lactobacillus casei</i> ve 6 <i>Lactobacillus fermentum</i> suşu B-galaktosidaz enzimine sahip 10 suş Simüle gastrointestinal ortamdacanlılığı koruduğu Tüm suşlar vankomisin ve kanamisin antibiyotikğine dirençli <i>L. casei</i> SJRP38 ve <i>L. fermentum</i> SJRP43 yüksek probiyotik potansiyel	(Maria vd., 2019)
175 LAB <i>Lactobacillus plantarum</i> (16), 2 <i>Lactobacillus paracasei</i> (2), <i>Enterococcus faecium</i> (2), <i>Lactobacillus helveticus</i> (1), <i>Weissella paramesenteroides</i> (1), <i>Pediococcus pentosaceus</i> (1) <i>E. faecium</i> S1113, <i>E. durans</i> S104, S1121 ve S202 suşları (2) <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> , (1) <i>Loigolactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> .	Geleneksel Beyaz Peyniri	Çin	4 patojen bakterileri için 23 suş antimikrobiyal etki göstermesi Önemli anti oksidatif kapasite 5 suş antibiyotiklere karşı az dirençli olması 5 suş hemolitik aktivitesinin olmaması	(Shi vd., 2019)
	Geleneksel Beyaz Peyniri	Türkiye	Tümizolatlar antimikrobiyal aktivite göstermesi 12 LAB yüksek inhibitör etki patojenlere karşı <i>E. faecium</i> S1113, <i>E. durans</i> S104, S1121 ve S202 suşları düşük pH , sıcaklıklarda (10–15 °C), ve yüksek tuz konsantrasyonlarında (%6–9) adaptasyon özellik	(Mohammed ve Çön, 2021)
<i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. sake</i> , <i>Lb. planatrum</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Enterococcus faecium</i>	Kradi Peyniri	Hindistan	<i>L.plantarum</i> en yüksek antimikrobiyal aktivite ve hidrofobisiye özellik göstermiştir. Kradi peynirinin simüle mide bağırsaksindirimi sonrasında biyoaktivite özellik göstermesi	(Mushtaqvd., 2021)

Mohammed ve Çön (2021) Samsun ilinden, 25 adet geleneksel yöntemlerle üretilmiş beyaz peynir örneklerinden 160 LAB'si izole etmiş ve probiyotiklik özellikleri bakımından incelemiştir. 12 izolat maksimum antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Bu izolatların 9 tanesi *Enterococcus* cinsine ait türlerdir. 2 tanesi *Lactiplantibacillus pentosus*, 1 tanesi *Loigolactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* tir. İzolatların potansiyel probiyotik özellikleri *in vitro* testler ile analizlenmiştir. Sonuç olarak, *E. faecium* S1113, *E. durans* S104, *E. durans* S1121 ve *E. durans* S202 suşları safra mide suyuna dirençlilik, asit üretebilme yeteneği, antibiyotik direnç, farklı pH ve sıcaklıklarda büyüme göstermiştir. Ayrıca β -galaktosidaz enzimi üretimi bulgulanmıştır.

Shi vd. (2019) Kuzey Çin bölgesi'nde üretilen geleneksel peynirlerden LAB izole etmişlerdir. 322 izolattan 175 laktik asit bakterisi probiyotiklik yönünden karakterize edilmiştir. 23 izolatın dörtten fazlası *Enterococcus* türü ve patojenik bakterilere karşı antibakteriyal etki göstermiştir. 23 izolat *Lactobacillus* (18), *Enterococcus* (2), *Weissella* (1) ve *Pediococcus* (2) cinslerine ait türler olarak tanımlanmıştır. Yüksek düzeyde hidrofobisite özelliğine sahip oldukları ve hemolitik aktivitesinin olmadıkları bildirilmiştir. Değişen düzeylerde antioksidant özellik gösterdikleri de bulgulanmıştır.

Mushtaq vd. (2021) Kradi peynirinden 5 baskın karakterli LAB izolat elde etmişlerdir. Potansiyel probiyotik özellik gösteren bu izolatlardan, *Lb. plantarum* yüksek hidrofobisite ve patojen bakterilere karşı antimikrobiyal özellik göstermiştir. Ayrıca peynir numunesi simüle edilmiş gastrointestinal sindirime tabi tutularak suda çözünür peptit özünde edilmiştir. ABTS radikal inhibisyonunu indigeme gücü, lipid peroksidasyon inhibisyonu, α -glukosidaz inhibisyonu ve α -amilaz inhibisyonu dahil olmak üzere suda çözünür peptit özünün biyoaktivite analizleri 0 ila 420 dakika sindirim aralığında sırasıyla %12,03'ten %58,89'a, %14,85–55,72, %14,67–52,43, %15,55–57,65, %17,88–%59,33'e önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir. Suda çözünür peptit özünün anti-kanser ve anti-hipertansif aktivitesi, simüle edilmiş mide-bağırsak suyunda sindirimin ardından %13,44'ten %69,39'a ve %19,75–71,23'e değerlerinin yükseldiği bildirilmiştir.

Maria vd. (2019) Serpa peynirinden *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Enterococcus* cinsine ait toplam 116 LAB izolatı elde etmişlerdir. Yirmi suş, gastrointestinal sistemde bulunan stres koşullarına daha iyi tolerans göstermiştir. *Lactobacillus brevis* C1Lb21'i yeterli otoagregasyon kabiliyeti ve daha yüksek hidrofobisite özellikleri ile vurgulanmıştır. Bununla birlikte, antibiyotik direnci ve biyojenik amin üretimi nedeniyle sekiz suş çıkarılmıştır. Sonuç olarak, gastrointestinal geçiş toleransı, bağırsaklarda kolonize

olabilmesi için, güvenlik özellikleri ve prebiyotik metabolizmaları göz önüne alındığında, *Lb. brevis* C1Lb21, *Lb. plantarum* G1Lb5 ve *Lb. pentosus* G4Lb7, yeni bir fonksiyonel peynir prosesi için umut verici adaylar olarak bulgulanmıştır. LAB büyümesini destekleyici, kısa zincirli yağ asitleri üretimini teşvik etmek için laktüloz prebiyotikli simbiyotik bir ticari peynirin geliştirilmesinin insan sağlığını olumlu yönde etkileyebileceği gözlemlenmiştir.

Jabbari vd. (2017) geleneksel yöntemlerle üretilmiş Kouzeh peynirinden izole edilen LAB izolatlarının bazı patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Toplamda izole edilen 56 laktik asit bakterisi morfolojik ve biyokimyasal yöntemlerle incelenmiş, bunlardan 12'si biyokimyasal yöntemle *Lactobacillus plantarum* olarak tanımlanmış ve 11'i de moleküler yöntemle doğrulanmıştır. Bu izolatların antimikrobiyal aktiviteleri analiz edilebilmesi için kuyu difüzyon yöntemi uygulanmıştır. İzole edilen *Lb. plantarum*, patojenik bakterilere karşı inhibitör aktivite göstermiş ve farklı inhibisyon zonları oluşturduğu bulgulanmıştır. *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis*'e karşı daha büyük antimikrobiyal zonlar gözlenmiştir (sırasıyla $15 \pm 0,3$ ve $14,8 \pm 0,7$ mm). *Escherichia coli*'nin inhibisyon zonu diğer patojenlerden daha küçüktür ve bazı *Lb. plantarum* tarafından üretilen antimikrobiyal bileşiklerin, dirençli olan *E.coli*'ye karşı herhangi bir inhibitör aktivite göstermediği gözlemlenmiştir. Antimikrobiyal aktivite özellik gösteren *Lb. plantarum* izolatları, güçlü probiyotik özelliklere sahip olduğu bulgulanmıştır.

Plessas vd. (2017) ticari ve geleneksel yöntemlerle üretilmiş Feta tipi beyaz peynirlerden 45 adet LAB suşu izole etmişler ve düşük pH direnci, pepsin ve pankreatin direnci ve safra tuzlarına tolerans dahil olmak üzere bir dizi potansiyel probiyotik açısından *in vitro* analizlere tabi tutmuşlardır. Referans suşu *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917'ye benzer veya ondan daha iyi özellikler sergileyen K5 suşu, daha ileri analizler için incelenmiştir. İlk olarak, multipleks PCR analizi, yeni suşun *Lb. paracasei* türüne ait olduğunu göstermiştir. Potansiyel probiyotik suşun güvenli bir şekilde kullanılmasını sağlamak için yaygın antibiyotiklere karşı duyarlılık belirlenmiştir. Ek olarak, *L. paracasei* K5'in nar suyunun fermentasyonunda starter olarak performansı, teknolojik özelliklerini değerlendirmek için incelenmiştir.

Azat vd. (2016) geleneksel olarak fermente edilmiş Xinjiang peynirinden 6 LAB suşu izole etmişler, starter kültür olarak fonksiyonel vepotansiyel probiyotik özellikleri açısından değerlendirmişlerdir. İzole edilen altı LAB suşu, *Lactobacillus rhamnosus* (bir suş), *Lactobacillus helveticus* (bir suş) ve *Enterococcus hirae*'den (dört suş) oluşmaktadır. 6 suşun tümü asidik ve safra tuzu koşullarına tolerans göstermiştir. Bunların arasında, *L.*

*ramnosus*R4 suşu daha yüksek oranda antimikrobiyal, otoagregasyon ve hidrofobisite göstermiştir. Ek olarak, *L. ramnosus* R4 suşu en yüksek seviyede serbest radikal süpürme aktivitesi sergilemiştir(1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikallerinin %53,78'i ve hidroksil radikallerinin %45,79'u). *L. ramnosus* R4 ayrıca sırasıyla %50,97 ve %28,92 oranında kolesterol ve trigliserit degradasyonu göstermiştir. Bu LAB suşlarının konak ömrü üzerindeki sağlığı geliştirici etkilerini daha fazla incelemek için *in vivo* model olarak *Caenorhabditis elegans* kullanılmıştır. Xinjiang'ın fermente süt ürünlerinden izole edilen suşların peynir endüstrisinde yüksek potansiyele sahip starter kültürler olarak kullanılabileceği bulgulanmıştır.

Ghahremani ve Mardani (2015)Horamabad şehrinde geleneksel fermentasyon yöntemleri ile üretilen peynirlerdenLAB izole etmişler ve bu suşları tanımlanayıp probiyotik potansiyelleri incelemişlerdir. İzole edilen LAB, fenotipik ve genotipik yöntemler (PCR-sekanslama)kullanılarak karakterize edilmiş; bir sonraki aşamada, kolesterol düşürücü, safranin hidrolizi, safra tuzunave midede asit ortama karşıdirençlilik özellikleri analiz edilmiştir. Analizler sonucunda 88 kok ve 3 basil bulunmuş: 58'i *Enterococcus faecium*, 16'sı *Enterococcus hirae*, 5'i *Lactococcus lactis*, 3'ü *Lactobacillus plantarum* ve 9' u tanımsız olarak bulgulanmıştır. Tüm bakterilerkolesterolün düşürücü, mide asidine tolerans, antimikrobiyel etki gösterdiği ve bazı suşların da safrayı hidrolize etmesi gibi probiyotiklik özelliklerinin etkiliolduğu gözlemlenmiştir. Olgunlaşmış peynirdeki yüksek NaCl konsantrasyonu, LAB üzerinde olumsuz bir etkiye ve peynirde hacim kaybına neden olmuştur. Ek olarak, bu çalışmada LAB'ların sütün pıhtılaşması sırasında ortalamda log kob/ml'sinin arttığını ve olgunlaşmış peynirlerde de azaldığı gözlemlenmiştir. Bu sebeple araştırma taze ve pıhtılaşmış peynirler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucu, *E. faecium* ve *L. lactis*'in patojen üzerinde inhibitör etkisi olduğunu göstermiştir. Bu bakterilerin aynı zamanda çoğu antibiyotiğe karşı uygun antibiyotik direncine sahip olmasıyla birlikte diğer faydasal etkileriyle süt ürünlerine eklenerek, patojenik bakterilere karşı güvenliğini artırması beklenmektedir.

Beatriz vd. (2014) Manda Mozzeralla peynirinden izole LAB suşlarınıprobiyotik özellikleri bakımından (farklı pH değerlerinde ve safra tuzu konsantrasyonunda stabilite, otoagregasyon ve koagregasyon, antibiyotik ve ticari ilaçlar varlığında hayatta kalma, β -galaktosidaz üretimi çalışması, kodlayan genlerin varlığının değerlendirilmesi) analiz etmişlerdir. Dört LAB suşu(*Lactobacillus casei* SJRP35, *Leuconostoc citreum* SJRP44, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SJRP57 ve *Leuconostoc mesenteroides*) MapA

ve Mub yapışma proteinlerine tutumu ve EF-Tu uzama faktörü ile virölans faktörünü kodlayan genlerin varlığında antimikrobiyal (antimikrobiyal peptitler) üretimleri açısından değerlendirilmiştir. Suşlar, MRS broth, tam ve yağsız sütte modellenen simüle gastrointestinal sistemde canlılığını korumuştur. Tüm suşların otoagregasyon ve hücre yüzeyi hidrofobikliği yüksek düzeylerde ve indikatör suşlarla çeşitli derecelerde koagregasyonları gözlemlenmiştir. Tüm suşlar, bazı antibiyotiklere düşük direnç göstermiştir. Yalnızca SJRP44 suşu, β -galaktosidaz enzimini üretmemiştir. Ayrıca, SJRP57 suşu, virölans faktörlerini kodlayan herhangi bir genin varlığını göstermemiş; bununla birlikte, SJRP35 suşu vankomisin direnci ve kollajen genlerinin yapışmasını göstermiştir, SJRP44 suşu ornitin dekarboksilaz genini barındırdığı gözlemlenmiştir.

2.5. Peynirde Probiyotik Mikroorganizmaların Canlılığını Etkileyen Başlıca Faktörler

Sağlığa olan faydaları nedeniyle probiyotik mikroorganizmalar yumuşak, yarı sert ve sert peynirler, yoğurt, dondurma ve dondurulmuş sütlü tatlılar dahil olmak üzere süt ürünlerine entegre edilmiştir. Kültürel açıdan çeşitli çalışmalar probiyotik gıda taşıyıcıları olarak fermente süt veya yoğurda probiyotik suşların konsantre edilmesinin veya karıştırılmasının yüksek kaliteli bir probiyotik ürün eldesi için önermiştir. Ancak bu ürünlerin tüketilmesiyle probiyotik sayısının standart düzeyde kalmasının garantisi yoktur. Peynir, canlı probiyotik mikroorganizmaların yeterli miktarda insan vücuduna alımı ile tedavi edici sağlık faydaları sağlayan bir tür fermente süt ürünüdür (Homayouni vd., 2018).

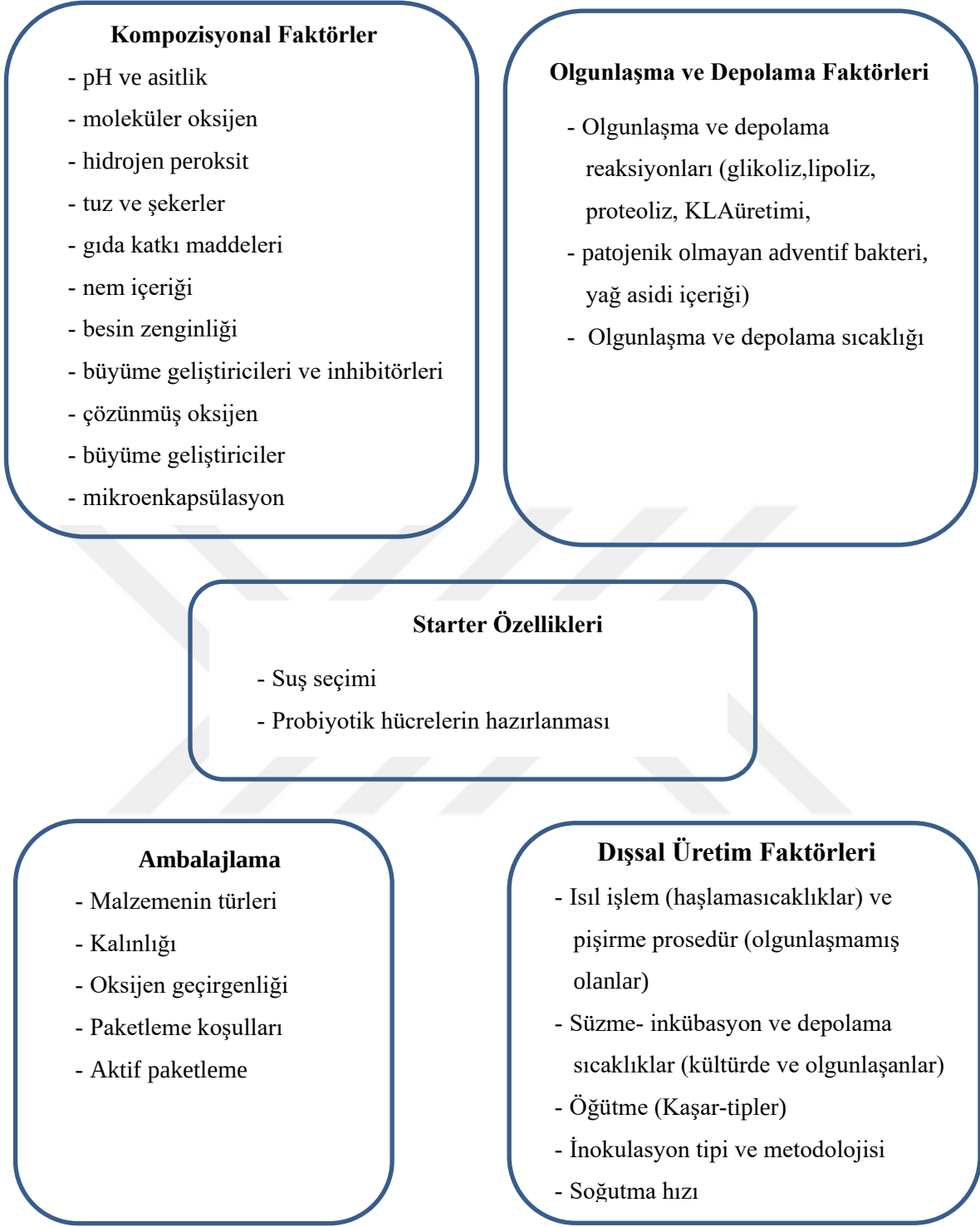
Peynirin tekstürünün yanı sıra pH, oksijen düzeyi, lipid içeriği ve depolama şartları probiyotik mikroorganizmaların canlılığını uzun süre koruması bakımından uygun bir fermente süt ürünüdür. Peynir üretimi ve depolanması boyunca probiyotiklerin hayatta kalma oranını artırabildiği ve gastrointestinal sistemde de canlılıklarını koruduğu gözlemlenmiştir (Bolyston ve Vindorela, 2004).

Taze peynir ve olgunlaşmış peynirde diğer fermente süt ürünlerine göre probiyotik bakterilerin canlılıklarını daha uzun süre koruyabildikleri gözlemlenmiştir. Taze peynir, (iyi bir probiyotik taşıyıcısı olarak) insan bağırsağında mikroorganizmaların canlılığını koruması açısından ve ayrıca, sağladığı endüstriyel uygulanabilirliğinden dolayı probiyotiklerin peynir teknolojisinde geniş kullanımını açıklamaktadır (Homayouni vd.,

2018).Probiyotik mikroorganizmaların izolasyonu ile ilgili yakın zamanlı çalışmalar izelge 2.4 verilmiştir.

Probiyotik bakterilerin peynirde tüketim anına kadar canlılığını etkileyen faktörler içsel ve dışsal faktörler olarak ayrılabilir, örneğin;pH, organik asitler, hidrojen peroksit, çözünmüş oksijen, olgunlaşma ve depolama sıcaklıkları, sodyum klorür, şeker gibi katkı maddeleri ve antimikrobiyal koruyucular ve uçucu bileşikler içsel faktörler olarak sınıflandırılabilir. Daha teknolojik bir yaklaşımla, söz konusu faktörler, paketlemenin yanı sıra formüle etme ve işleme faktörleri olmak üzere üç alanda kategorize edilebilir ve peynirde probiyotik bakterilerin canlılığını etkileyen ana faktörler olarak gösterilmektedir. Bu faktörler aşağıda ifade edilmiştir(Mortazavian veCruz, 2011).





Şekil 2.2. Peynirde probiyotik bakterilerin canlılığını etkileyen ana faktörler (Roy vd., 1997; Talbot-Walsh vd., 2018).

Çizelge 2.4. Probiyotik mikroorganizma izolasyonu için seçilmiş çalışmalar.

Probiyotik Mikroorganizma	Probiyotik Kriterler	İzolasyon Kaynağı	Referans
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Gastro intestinal iyi canlılık	Geleneksel süt ve süt ürünleri	(Bao vd., 2010)
<i>L. rhamnosus</i>	Yüksek aside ve safra tuzuna tolerans	Ragusano ve Pecorino Siciliano peynirleri	(Caggia vd., 2015)
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Güçlü antimikrobiyal aktivite	Çiğ inek sütü	(Shehata vd., 2016)
LAB	Aside ve safra tuzuna tolerans	yeni doğan dışkısı	
		Balık	
		Fermente gıdalar(boza vb.)	
		Peynir (<i>Ras</i> , <i>Kareish</i>)	
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917	Aside ve safra tuzuna dirençlilik ve antimikrobiyal etki	Feta tipi beyaz peynir	(Plessas vd., 2017)
<i>Lb. paracasei</i> K5	önemli ölçüde oto aggregasyon yeteneği ve yüksek hidrofobisite antibiyotik dirençleri	Serpa peynir	(Ruiz-Moyano vd., 2019)
<i>Lb.pentosus</i> G4Lb7 <i>Lb. plantarum</i> G1Lb5.	biyojenik amin üretimi		
<i>Lb. brevis</i> C1Lb21,	İzolatlar ve hücresiz süpernetantları patojenlere karşı güçlü inhibisyon göstermesi		(Oıldak vd., 2019)
<i>Lb. plantarum</i> Os4ve	antagonistik özellik		
<i>Lb. plantarum</i> Kor14	Patojenlere karşı iyi antagonistik özellik	Geleneksel peynir	(Margalho vd., 2021)
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1QB77	Yüksek adhezyon		
220 LAB	Gastointestinal canlılık		
<i>Enterococcus faecium</i>	Hemolitik aktivite	Tulum peynir	(Özkan ve Demirci, 2021)
	Antibiyotik dirençlilik		
	Yüksek EPS üretimi ve Kolestrol asimilasyonu		
<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> ve <i>E. durans</i>	Aroma üreticileri değişken asit toleransı, hidrofobiklik, oto-agregasyon, antimikrobiyal aktivite	Geleneksel beyaz peynir	(Albayrak ve Duran, 2021a)

Özkan ve Demirci (2021) Türkiye’de geleneksel yöntemlerle üretilmiş tulum peynirlerinden izole edilen 9 adet *Enterococcus faecium* izolatının probiyotiklik özellikleri, fonksiyonellikleri ve güvenilirliklerini analiz etmişlerdir. Tüm suşların simüle gastrik koşullara ve safra tuzuna tolerans gösterdiği gözlemlenmiştir. İzolat 1050 dışında tüm izolatlar vankomisine duyarlılık göstermiştir. İzolatların çoğu, yüksek ekzopolisakkarit üretimi gösterirken, 12 izolatın kolesterol asimilasyon özelliği gösterdiği bulgulanmıştır. İzolatlardan beş tanesi patojenlere göre antimikrobiyal etki göstermişlerdir. İzolat 894’te, asa1, gelE ve CylA dahil olmak üzere üç virülans geni tespit edilmiş, izolat 394’te ise virülans cylLL,S, cylM, Hylefm, gelE ve CylA genleri belirlenmiştir.

Oldak vd. (2019) Polonya’nın farklı yöresel peynirlerinden (Oscypek ve Korycinski) izole ettikleri 29 *Lactobacillus plantarum* suşunu, probiyotiklik özellikler ve antimikrobiyal aktivite açısından değerlendirmişlerdir. *L. plantarum* suşlarının, hücresiz süpernatantlarının (CFS’ler), *Staphylococcus aureus*’a karşı inhibe edici özellik gösterdiği gözlemlenmiştir.

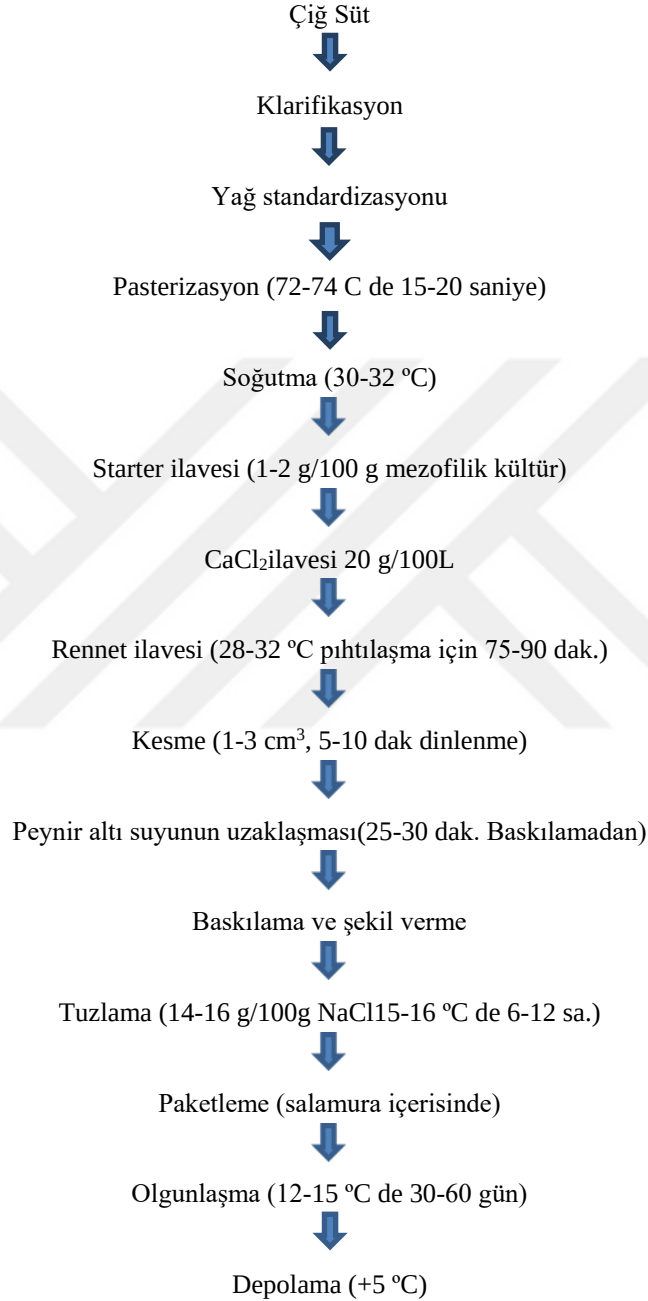
2.6. Probiyotik Kaynağı Olarak Beyaz Peynir

Peynir yapımı yaklaşık 8000-9000 önce Dicle ve Fırat nehirleri arasındaki “Bereketli Hilal” bölgesinde ortaya çıkmıştır (Fox vd., 1996; Kosikowski vd., 1997). Bu bölge şimdi Türkiye, Irak ve İran’ın bir parçasını oluşturmaktadır. Dünyada peynir çeşidi olarak 1000’den fazla üretim yapılmaktadır. Türkiye’de bilinen peynir çeşitleri 196 civarındır, ancak bu peynir çeşitlerinden üçü; Türk Beyazı (orijinal adı Beyaz peynir), Kaşar ve Tulum peynirlerinin ulusal ve ekonomik payı yüksektir (Yılmaztekin vd., 2004).

Beyaz peynir koyun, keçi veya inek sütünden veya bunların karışımından ısıtma işlemi görmeden üretilen ve salamurada olgunlaştırılan yumuşak veya yarı sert tipte bir peynir çeşididir. Günümüzde ticari Beyaz peynir üretiminde çiğ süt yerine pastörize süt de kullanılmaktadır. Ülkemizde beyaz peynir üretiminin ilişkin akış şeması Şekil 2.4 gösterilmiştir.

Beyaz peynir salamura olarak yapılmakta ve salamura (12-14g/100ml) ortamında olgunlaştırılmaktadır. Genel olarak kübik ya da dikdörtgen prizma tipik 7x7x7 ve ya 7x7x10 cm³ boyutlarında ve 350-500g ağırlığındadır. Geleneksel veya artisanal üretiminde 1-3 aylar arasında olgunlaştırılmaktadır. Geleneksel üretimde starter kullanılmamaktadır. Süt pastörize edilmez.

Beyaz peynirin florasında başlıcalaktik bakteri florasının bileşimine gelince, *Lc. lactis* subsp.*lactis* türleri ve bunların yanısıra *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei* ve *Leuconostoc mesenteroides* gibi başlıca türler olup pekçok çalışmada tanımlanmıştır(Çelik ve Uysal , 2009).



Şekil 2.3. Beyaz peynir akış şeması(Yilmaztekin vd., 2004).

Probiyotik beyaz peynir ile yakın zamana kadar yapılan çalışmaların çoğunda insan kaynaklı probiyotik kültürler kullanılmıştır. Ancak yakın zamanlarda yapılan pek çok çalışmada, geleneksel beyaz peynirlerden elde edilen mikroorganizmaların da önemli ölçüde potansiyel probiyotik özellik gösterdiği gözlemlenmiştir. Özellikle Enterekok cinsine ait

bakterilerin beyaz peynirden sıklıkla izole edildiği ve probiyotik özelliklere sahip oldukları bildirilmiştir(Gürsoy ve Kınık, 2005 ;Albayrak ve Duran, 2021a).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Peynir Örnekleri

Probiyotik özellikli LAB izolasyonu için, çiğ süt kullanılarak geleneksel yöntemlerle üretilmiş 6 farklı beyaz peynir örneği ve 1 adet işletme koşullarında üretilmiş beyaz peynir örneği (KP kodlu) kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Peynir örnekleri ve özellikleri.

No	Sütün Çeşidi	Kaynak	Kod Numarası	Olgunlaşma Zamanı
1	Koyun sütü	Tire süt kooperatifi	KP	24 ay
2	İnek sütü	Diyarbakır	SB	2-3 ay
3	İnek sütü	Manisa/Alaşehir	İP	2-3 ay
4	Keçi sütü	Manisa/Alaşehir	KEP	2-3 ay
5	Koyun sütü	Manisa/Alaşehir	KOP	2-3 ay
6	Koyun sütü	Manisa/Alaşehir	ÇBA	2-3 ay
7	Koyun sütü	Manisa/Alaşehir	ST	9 ay

3.1.2. Laboratuvar Ölçekli Peynir Üretiminde Kullanılan Çiğ Süt, Starter Kültür ve Peynir Mayası

Laboratuvar ölçekli peynir üretim denemelerinde kullanılmak üzere çiğ inek sütü Tire süt Kooperatifi'nden temin edilmiştir. Peynir starter kültürleri NFC DOSH 602 (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ve *St. thermophilus*) direkt kullanıma uygun liyofilize formda NFC Gıda ve Kimya İzmir' den temin edilmiştir. Mayasan Gıda San. ve Ticari A.Ş' den 50cc olarak sağlanan peynir mayası peynir üretimlerinde kullanılmıştır.

Çizelge 3.2.İnek Sütü örneklerinin kimyasalözellikleri.

No	Süt	pH	Laktit asit (%)	Yağ (%)	Kuru Madde (%)
S1	Tire Süt Kooperatifi	6,45±0,01	0,27±0,00	3,45±0,07	12,04±0,16
S2	Tire Süt Kooperatifi	6,48±0,01	0,25±0,00	3,75±0,07	11,64±0,14

3.1.3. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar, besiyerleri ürün kodları ile birlikte EK-1’desunulmuştur.

3.2.Yöntem

3.2.1.Peynir Örneklerinin Asitlik Özelliklerinin Belirlenmesi:

3.2.1.1. Potansiyometrik Yöntem

Peynir örneklerinin asitlik özellikleri potansiyometrik ve titrasyon yöntemleri ile belirlenmiştir.Bu amaçla, Henna Edge marka pH metre kullanılarak ölçümler yapılmıştır. 2,5 g tartılan beyaz peynir örnekleri20 ml distile su ilave edilerek homojen hale getirilmiş, cihazın elektrodu içerisine daldırılarak pH değerleri ölçülmüştür.

3.2.1.2. Titrasyon Yöntemi

Erlenmayere 10 g peynir örneği tartılmış ve üzerine 105 ml distile saf su ilave edilmiştir.Ardından, baget yardımıyla peynir örneklerinin ezilmesi sağlanmıştır. Elde edilen karışım iyice karıştırıldıktan sonra huniye yerleştirilerek kaba filtre kâğıdıyla süzölmüştür. Süzöntüden pipetle 25 ml alınarak (2,5g peynir içermektedir) erlene boşaltılmış ve üzerine 2-3 damla fenolfitaleyn çözeltisi ilave edilmiştir. Büret kullanılarak 0,1 N NaOH çözeltisiyle 30 saniye boyunca kaybolmayan açık pembe renk oluşana kadar titrasyon

yapılmıştır. Sarfedilen NaOH hacminden % Laktik asit değeri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% \text{Laktik asit} = \frac{N * F * E * (V1 - V2)}{m} * 100 \quad (1)$$

N: Kullanılan NaOH'ın normalitesi (0,1 N)

F: 0,1 N NaOH faktörü (Gerçek normalite = Yaklaşık normalite x Faktör)

E: Laktik asit miliekivalent ağırlık (0,09 mEq/L)

V1: Titrasyonda peynir için sarf edilen NaOH miktarı (ml)

V2: Titrasyonda saf su için sarf edilen NaOH miktarı (ml)

M: peynir miktarı (g)

3.2.3. Geleneksel Peynirlerden LAB İzolasyonu

3.2.3.1. İzolasyon ve Saflaştırma

LAB geleneksel peynir örneklerinden %0,1 (A/H)'lik peptonlu su kullanılarak seri dilüsyon hazırlanarak uygun olan dilüsyonlarından katı besiyerine ekim yapılmıştır. Katı besiyerinde sayımlar yapılmış ve değişik morfolojiye sahip koloniler izole edilmiştir. İzolasyon için, dökme plaka metodu ile MRS agar besi ortamında 37°C de 48 saat oksijensiz koşullarda inkübasyonlar yapılmıştır. Bu amaçla, peynir örneğinden 10 g tartılmış ve üzerine 90 ml peptonlu su ilave edilerek havan içerisinde homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat 10⁻¹ olmakla birlikte, bu dilüsyondan 1 ml alınıp 9 ml'lik peptonlu dilüsyon sıvısına transfer edilerek 10⁻² dilüsyon hazırlanmıştır. Ardından, seri seyreltme işlemiyle hazırlanmış 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ ve 10⁻⁶ dilüsyonlarından 1ml alınarak boş steril petri kaplarına aktarılmıştır. Üzerine dökme plaka yöntemine uygun şekilde MRS agar ilave edilmiştir. Besi ortamı katılaştıktan sonra 37°C'de 48 sa oksijensiz koşullarda inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrası, 30-300 koloni bulunduran petriler LAB sayımında kullanılmıştır. Petrilerde büyüyen kolonilerden MRS sıvı besi ortamına aktarılıp, 37°C'de 24 saat inkübe

edilmiştir. Sıvı besi ortamındaki pasajlama işlemi en az 3 kez olacak şekilde kültürler aktif hale gelene kadar tekrarlanmıştır.

Ardından, kültürler çizgi plaka yöntemiyle ile saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemine tek tip koloni morfolojisi elde edilene kadar devam edilmiştir. Petrilerdeki benzer kolonilerden tek koloni alınarak gece boyu büyütülmüş ve Gram boyama yöntemi ile boyanmıştır. Ardından, hücre morfolojileri ışık mikroskop ile incelenmiştir. Çizgi plakadaki koloni görüntüsü ve Gram boyamadaki hücre morfolojisi ile saf bakteri olduğu doğrulanan izolatlar katalaz testi uygulanmıştır. Bu şekilde Gram pozitif (+) , katalaz negatif (-) özellik gösteren izolatlar ön tanımlama olarak LAB şeklinde değerlendirilmiştir.

3.2.3.2. Morfolojik İnceleme ve Ön Tanımlama

3.2.3.2.1. Basit Boyama

İzolatların saflık kontrolü için basit boyama tekniği kullanılarak ışık mikroskopunda incelenmiştir. Bu amaçla, taze aktif kültürler lamel üzerine öze yardımıyla aktararak bir süre kurumaya bırakılmış ve daha sonra 2-3 kez aleve maruz bırakılarak fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Üzerine metilen mavisi ilave edilmiş ve 1-2 dakika kadar bekledikten sonra fazla boya saf su ile uzaklaştırılmıştır. Pamuklu havlu üzerine alınarak kurumaya bırakılmıştır. Işık mikroskobu ile saf homojen olarak belirlenen izolatlar katalaz testi için hazırlanmıştır.

3.2.3.2.2. Katalaz Testi

Katalaz, birçok organizma tarafından üretilen bir enzimdir. Bakterilerin katalaz pozitif/negatif olma durumu sınıflandırmada önemli bir kriterdir. Enzimin, hidrojen peroksiti parçalayarak su ve oksijene dönüştürmesi ile gaz kabarcıkları gözlenmektedir. LAB, katalaz negatif olarak bilinmektedir. Bu nedenle, katalaz durumunu doğrulamak için izolatlar katalaz testi yapılmıştır. Bu amaçla, 37 °C'de MRS sıvı besiyerinde gece boyu büyütülen taze izolatlardan 20 µl cam lam üzerine alınıp eş hacimde % 5 (H/H) hidrojen

peroksit ilave edilmiştir. Katalaz negatif olarak gözlemlenen izolatlar uzun süreli kullanım için stok kültürleri hazırlanmıştır. Aşağıdaki formülde hidrojen peroksitin su ve oksijene parçalanması gösterilmiştir;



3.2.3.3.3.Gram Boyama

LAB Gram pozitif (+) ve sporsuz bakterilerdir. Kok veya çubuk şeklinde olabilirler. Gram boyama için önce gece boyu MRS sıvı besiyeri içerisinde büyütülmüş taze izolatlardan 15 µl mikroskop lamı üzerine alınmıştır. Alev yanında kuruduktan sonra, 1-2 sn aleve maruz bırakılarak hücrelerin lama fiksasyonu sağlanmıştır. Üzerine kristal mor solüsyonu (EK-2) 1 dakika boyunca uygulanmış boyanın fazlası saf su ile uzaklaştırılmıştır. Ardından preparat üzerine iyot çözeltisi (EK-2) 1 dakika boyunca uygulanmıştır. Fazla iyot saf su ile uzaklaştırıldıktan sonra % 96'lık alkol ile 5-10 sn boyunca muamele edilmiştir. Sonrasında preparatın üzeri tamamen kaplayacak şekilde safranin solüsyonu (EK-2) ile 30 sn boyunca boyama yapılmıştır. Boyanın fazlası saf su ile yıkandıktan sonra, ışık mikroskop görüntüsü mavi mor renk Gram (+) özellik, pembe renk ise Gram (-) özellik olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4.İzolatların Uzun Süreli Muhafazası

Gram pozitif (+), katalaz negatif (-) gösteren saflaştırılmış izolatların ileriki deneylerde kullanılmak üzere stok kültürleri hazırlanmıştır. Bu amaçla, gece boyu MRS sıvı besiyerinde büyütülmüş kültürlerden 500 µl alınarak steril ependorf tüplerine transfer edilmiştir. Üzerine %40(H/H) gliserol bulunduran MRS sıvı besi yeri ilave edilerek son gliserol konsantrasyonu %20(H/H) olarak ayarlanmıştır. Hazırlanan gliserol stokların uzun süre kullanım için -20 °C ve -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.5. Aside ve Safra Tuzuna Tolerans Özelliklerine Göre Ön Eleme

Gram pozitif (+) , katalaz negatif (-) saflaştırılmış ve hücre morfolojisi belirlenmiş izolatlar başlıca probiyotik kriterler içerisinde yer alan aside ve safra tuzuna tolerans özellikleri bakımından test edilmiş ve buna göre ön elemeler yapılmıştır.

3.2.5.1. İzolatların Aside Toleransı

İzolatların asit toleransları Argyri vd.(2013) 'nin belirttiği şekilde küçük modifikasyonlar yapılarak belirlenmiştir. 2 ml MRS sıvı besiyerinde 37° C de gece boyu büyütülmüş izolatlar 5000g'de 10 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra üzerindeki süpernatant uzaklaştırılmış ve elde edilen pellet eşit hacimde fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS; pH 7,4)(EK-4)ile süspanse edilmiştir. Ardından,tekrar 5000g'de 10 dakika boyunca santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüş ve iki kez PBS ile yıkama yapılmıştır. Sonunda elde edilen pellet, mide asidini temsil eden pH 2,5 olarak 1M HCl ile ayarlanmış PBS içerisinde süspanse edilmiştir. Hazırlanan süspanسیون midede kalma sıcaklığı ve süresini temsil eden 37°C'de 180 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Örneklerden başlangıç anında (t₁) ve 180'inci dakikada (t₂)plaka yöntemi ile canlı sayım yapılmıştır. İzolatların asit toleransları logaritmik azalma olarak aşağıdaki şekilde ifade edilmiştir(Albayrak ve Duran, 2021a).

$$\text{Log Azalma} = \text{Log}(kob/ml)_{t_1} - \text{Log}(kob/ml)_{t_2} \quad (2)$$

Log (kob/ml)_{t1}: Başlangıçtaki logaritmik canlı sayısı

Log (kob/ml)_{t2}: 3 sa sonundaki logaritmik canlı sayısı

3.2.5.2. İzolatların Safra Tuzuna Toleransı

İzolatların safra toleransları Vinderola ve Reinheimer (2003)'e göre küçük değişikliklerle belirlenmiştir. 2 ml MRS sıvı besiyerinde 37°C de gece boyu büyütülmüş izolatlar farklı konsantrasyonlarda % 0,3, % 1 (A /H) safra içeren MRS sıvı besiyerine %1 oranında inoküle edilmiştir. Kültürler 37 °C'de 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. Kontrol

grubunun(safra ilavesiz) ve test örneklerinin 600nm absorbans değerleri ölçülmüş ve aşağıdaki şekilde safra tuzuna tolerans oranı ile belirlenmiştir(Albayrak ve Duran, 2021a).

$$\text{Safra tuzu toleransı oranı} = (A_{\text{deneysel}})/(A_{\text{kontrol}}) \quad (3)$$

A_{deneysel} :Safra ilaveli MRS içerisinde 4 sa inkübe edilen izolatların 600 nm’de absorbans değeri

A_{kontrol} :Safra içermeyen MRS içerisinde 4 sa inkübe edilen izolatların 600 nm’de absorbans değeri

Peynir izolatlarının aside ve safra tuzuna tolerans sonuçlarına göre ön eleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Safra ve aside karşı dayanıklılıklarına göre seçilen (15 adet) izolatların başlıca probiyotik özellikleri bakımından değerlendirilmek üzere diğer analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.3.Başlıca Probiyotik Özelliklerin Değerlendirilmesi

3.3.1. İzolatların Simüle Mide ve Pankreatik Sularına Toleransı

İzolatların simüle mide ve pankreatik sularına toleransı Maria vd. (2019)’ya göre küçük değişiklikler ile belirlenmiştir. Stoktan açılan kültürler en az iki kere pasajlandıktan sonra aktif hale getirilmiştir. Son pasajlama işleminde kültürler 10 ml MRS sıvı besiyerine %1 oranında inoküle edilerek büyütülmüştür. 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Steril falkon tüplerine aktarılan izolatlar, 2500 g’de 10 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra üzerindeki süpernatant uzaklaştırılmış ve elde edilen pellet eşit hacimde PBS; pH 7,4 ile süspanse edilmiştir. Yıkama işlemi 2 kez tekrar edilmiştir. Ve hücrelerden 1ml alınıp PBS içerisinde süspansiyonu hazırlanmıştır. Diğer taraftan,pH; 3,05 ayarlanmış PBS ortamına pepsin enzimi (0,3 g/100 ml) ilavesi ile simüle mide ortamı hazırlanmış ve filtre (0,45 µm gözenek çaplı)yardımı ile steril edilmiştir.Hazırlanan simüle mide ortamı 9’ar ml steril tüplere aktarılmıştır. PBS içerisine süspanse edilmiş olan izolatlardan 1 ml alınarak 9 ml’lik simüle mide suyuna aktarılmış ve 37°C ‘de 4 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Simüle mide geçişi sonrası 100 µl örnek alınarak canlı LAB sayımı yapılmıştır. Simüle mide ortamından geçen izolatların canlı sayımı için seri dilüsyonları MRS agar besiyerine ekilip 37 °C’de 4 sa inkübe edilmiştir.

Simüle bağırsak ortamı için pankreatin (0,1 g/100 ml) enzimi ve safra tuzu (0,15 g/100 ml) tartılarak üzerine 100 ml PBS (pH; 7,45) ilave edilmiştir. Solüsyon steril filtreden (0,45 µm) geçirildikten sonra 9' ar ml steril tüplere aktarılmıştır. Ardından mide suyunda inkübe edilen izolatlardan 1 ml bağırsak ortamına aktararak 37°C'de 6 sa boyunca inkübe edilmiştir. Simüle mide ve bağırsak ortamından geçen izolatların canlı sayımı için seri dilüsyonları MRS agar besiyerine ekilip ve 37 °C'de 48 sa inkübe edilmiştir. Canlı sayıları logaritmik olarak ifade edilmiştir.

3.3.2. Safra Tuzu Hidrolizi

İzolatların safra tuzu hidrolizi Argyri vd. (2013)'de tarif edildiği şekilde belirlenmiştir. MRS agar içerisine % 0,5 (A/H) taurodeoksikolik asit ilave edilerek hazırlanan ortam test besiyeri olarak kullanılmıştır. Gece boyu büyütülen izolatlardan 10 µl MRS agar üzerine spot yöntemi ile aktarılmış ve 37 °C'de anaerobik koşullarda 48 sa inkübe edilmiştir. Hidroliz etkisi, MRS agar üzerinde hücrelerin etrafındaki safra asit varlığı ile çökmeler, koloni morfolojisinde farklılaşmalar veya kolonilerin etrafında opak bir zon oluşturması gibi gözlemler ile değerlendirilmiştir. Taurodeoksikolik asit ilave edilmeyen MRS agar besiyerlerindeki spot izolat büyüme görüntüleri kontrol olarak kullanılmıştır.

3.3.3. Hidrofobisite Testi

İzolatların hidrofobisite özelliği ksilen, kloroform ve etilasetat hidrokarbonları kullanılarak belirlenmiştir (Albayrak ve Duran, 2021a). Gece boyu büyütülmüş izolatlar 5000g'de 10 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra üzerindeki süpernatant uzaklaştırılmış ve elde edilen pellet eşit hacimde PBS; pH 7,4 içerisine süspanse edilmiştir. Elde edilen pellet 3 ml PBS içerisinde son hücre konsantrasyonu yaklaşık 10⁸ kob/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Aynı tüplerde bulunan 1ml ksilen, 1ml kloroform ve 1ml etilasetat üzerine 3 ml hücre süspansiyonu eklenip ve 1 dakikalık vorteksleme aşamasından sonra 37 °C'de 1 sa boyunca inkübe edilmiştir. Yüzde hidrofobisite (H %) değeri, UV spektrofotometrik yöntemi kullanılarak aşağıdaki ifade kullanılarak hesaplanmıştır.

$$H \% = (1 - \frac{Abs_{t0}}{Abs_{t1}}) \times 100 \quad (4)$$

Absto: Hücre süspansiyonun başlangıç anındaki 600nm'deki absorbans değeri,

Abstı: Sulu fazın inkübasyon sonrasında 600nm'deki absorbans değeri .

3.3.4.Otoagregasyon Testi

Gece boyu büyütülmüş 2 ml hacimdeki izolatlar 5000g'de 10 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra üzerindeki süpernatant uzaklaştırılmış ve elde edilen pellet eşit hacimde 2 kez PBS; pH 7,4 ile yıkandıktan sonra 3 ml hacimde süspanse edilmiştir. 3 ml hücre süspansiyonu 1 dakikalık vorteksleme aşamasından sonra 37 °C'de 2 sa boyunca inkübe edilmiştir. Otoagregasyon yüzdesi, UV spektrofotometrik yöntemi kullanılarak aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır (Albayrak ve Duran, 2021a):

$$\text{Otoagregasyon \%} = (1 - \frac{Abs_{t0}}{Abs_{t1}}) \times 100 \quad (5)$$

Absto: Hücre süspansiyonun başlangıç anındaki 600nm'deki absorbans değeri

Abstı: Sulu fazın 1 sa inkübasyon sonrasında 600nm'deki absorbans değeri

3.3.5.Antimikrobiyal Aktivitenin Değerlendirilmesi

İzolatların patojen bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesi Argyri vd. (2013)'de tanımlanan şekilde küçük değişikliklerle birlikte Agar-Kuyu difüzyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. *E.coli* O157H7 NRRL B- 23588, *Bacillus cereus* ATCC 11778 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 suşları test organizmalar olarak kullanılmıştır. Gece boyu 37 °C 'de Nutrient broth sıvı besiyerinde büyütülen patojenlerden 100 µl alınarak Müeller Hilton Agar üzerine L baget yardımıyla yayma işlemi yapılmıştır. Patojenlerin hücre yoğunluğu yaklaşık 10⁶ kob/ml ayarlanmıştır. Ardından, agar üzerinde steril 1000 µl kapasiteli pipet ucu kullanılarak 5 mm çapında kuyular açılmıştır. Potansiyel probiyotik suşlar gece boyunca MRS içerisinde büyütüldükten sonra, santrifüjleme işlemiyle 5000 g'de 15 dakika süpernatantları ayrılmıştır. Sonrasında, 50 µl hücre bulundurmeyen LAB süpernatantları 5mm çapında açılan kuyulara pipetlenip 37°C'de 24 sa inkübe edilmiştir.

Kuyucuk çevresinde büyümeden bağımsız olarak oluşan şeffaf inhibisyon zonlarının çapları mm cinsinden ölçülüp değerlendirilmiştir.

3.3.6.Antibiyotik Direnci

İzolatların antibiyotik direnci, Kazancıgil vd. (2019)'in yöntemi göz önünde bulundurularak agar disk difüzyon tekniği ile belirlenmiştir. LAB suşları bir gece öncesinden MRS sıvı besiyerinde büyütülmüştür. Antibiyotik direncini değerlendirmek için 100 µl aktive edilmiş taze kültürler MRS agar üzerine yayma plaka yöntemi kullanılarak yayılmıştır. Ardından, 6 mm çapında ticari antibiyotik diskler (Bioanalyse) herbir petri üzerine 3-4 olarak yerleştirilmiştir. LAB izolatlarının, vankomisin (30 µg / disk), gentamisin (10 µg / disk), penisilin(10 µg / disk), kloramfenikol (30 µg/disk), eritromisin (15 µg/disk), streptomisin (10 µg/disk) ve tetrasiklin(30 µg/disk) gibi antibiyotiklere karşı duyarlılıkları değerlendirilmiştir. 37 °C'de 24 sa inkübasyondan sonra, inhibisyon zonlarının çapı (mm) ölçülmüştür. Sonuçlar belirtilen zon çaplarını dikkate alınarak duyarlı, orta derecede duyarlı ve dirençli olarak değerlendirilmiştir. İnhibisyon zon çapı 10 ila 35 mm arasında ise duyarlı (S), 10 mm'den küçük orta duyarlı (I) olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, inhibisyon zonu yokluğu da dirençli (R) olarak kabul edilmiştir(Kazancıgil vd., 2019).

3.4. Fizyolojik ve Biyokimyasal Karakterizasyon

3.4.1.Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Büyüme Testi

Bir gece öncesinden kültürlenen izolatlar 5 ml farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren MRS sıvı besiyerine (EK-3)% 1 oranında aktarılmıştır. İzolatların gelişimi % 4, % 6,5 ve % 10'luk tuz konsantrasyonlarında test edilmiştir. 37°C'de 7 gün inkübe edilerek, renk değişiminin mordan sarıya dönüşümü ve bulanıklık artması hücre büyümesinin kanıtı olarak tespit edilmiştir.

3.4.2. Farklı Sıcaklıklarda Büyüme Testi

Bir gece boyunca kültürlenmiş izolatlar 5 ml modifiye MRS sıvı besiyeri (EK-3) içeren tüplere % 1 oranında aktarılmıştır. Hücreler inoküle edildikten sonra 15°C ve 45°C'de 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. Bu sıcaklıkların herhangi birinde hücre büyümesi tespit edildiğinde kültürlerin renginde mordan sarıya doğru değişim ve bulanıklıkgözlemlenmiştir.

3.4.3. Glikozdan Gaz Oluşturma Testi

Homofermentatif izolatları tanımlamak için, glikozdan CO₂ üretimi testi uygulanmıştır. Bu amaçla, modifiye MRS(sitrat hariç)besiyeri (EK-3) hazırlanmış ve Durham tüpleri kullanılmıştır. Bir gece öncesinden kültürlenmiş izolatlardan, 8 ml test ortamına%1 oranında yani 80 µL aktarılmıştır. 37 °C'de inkübasyon süreci boyunca, Durham tüplerinde gaz birikimi, glikozdan CO₂ üretiminin gerçekleştiğini göstermiştir.

3.4.4.Arjinin Hidroliz Testi

Bu test LAB izolatlarının arjinaz enzimiyle temel aminoasitlerden arjinini hidrolize ederek amonyak oluşturmasını belirlemek amacıyla yapılmıştır. Arjinden amonyak oluşumunu saptamak için Arjininli MRS sıvı besiyeri ve Nessler reaktifi (EK-4) kullanılmıştır (Yavuzdurmaz, 2007).Bu amaçla, MRS sıvı besiyerine % 0,3 oranında L-arjinin monohidroklorit ilave edilmiş ve pH 6 olarak ayarlanmıştır. 5'er ml besiyeri ağzı kapaklı tüplere dağıtıldıktan sonra 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Arjininli MRS sıvı besiyerine aseptik koşullarda aktif kültürlerden %1 oranında inokülasyon yapılarak 37 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu 40 µl ml kültür lamüzerinealınarak40 µl Nessler reaktifi ilave edilmiştir. Sonuç olarak arjinin dehidrolaz enzimi içermeyen suşlarda renk sarıya, arjinin dehidrolaz enzimine sahip olanlarda ise renk kırmızı kiremit turuncuya dönmüştür.

3.4.5. Karbonhidrat Fermentasyon Testi

İzolatların karbonhidrat fermentasyon testi farklı şekerler ile 96 kuyulu mikrotitre plaka kullanılarak gerçekleştirilmiştir(Bulut, 2003).5 ml MRS sıvı besiyeri içerisine % 1 oranında inoküle edilmiş ve 37 °C'de 24 sa inkübe edilmiştir. Gece boyu büyütülen LAB izolatları, 5000g'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmişve süpernatantları uzaklaştırılmıştır. Hücreler modifiye MRS sıvı besiyeri (glikoz içermeyen ve pH indikatörü bromokresol mor içeren) ile yıkanıp, aynı besiyeri içerisinde yeniden süspanse edilmiştir. Karbonhidrat fermentasyonu için farklı şekerler(D-glikoz, ksiloz, laktoz, maltoz, mannitol, mannoz, riboz, selebiyoz, sükroz) kullanılmıştır. Şekerlerden 1 g alınarak % 10'luk solüsyonlar hazırlanmış ve (0,22 µm, Millipore)filtre ile sterilize edilmiştir. Şeker solüsyonlarından 40 µl alınarak her bir kuyucuğa pipetlenmiş, üzerine 160 µl süspanse edilmiş LAB izolatlarıilave edilmiştir. Böylece %2 şeker konsantrasyonları elde edilmiştir.96 plakalar 37°C' de 24 sa inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, renginin mordan sarıya dönmesi ve bulanıklılığın artmasıyla şeker fermentasyonunungerçekleştiği gözlemlenmiştir. Glikozun fermentasyonu pozitif kontrol, şeker bulundurmayan MRS sıvı besi yeri isenegatif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.5..İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin 16S rRNA ile Tanımlanması

Farklı peynir örneklerinden toplam 64 tane bakteri izolatu elde edilmiştir. Başlıca probiyotiklik özelliklerine göre ön eleme yapılan 15 izolattan potansiyel probiyotik özellik gösteren 5 izolatin moleküler tanımlamaları 16S rRNA dizi analizi ile gerçekleştirilmiştir. Bu analizler, Atlas Biyoteknoloji Şirketinde hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

3.6. Diğer Probiyotik Özellikler

3.6.1. HT-29 Hücre Hattına Tutunma

İzolatların bağırsak hücrelerine yapışma özelliği Li vd. (2017) göz önüne alınarak insan bağırsak adenokarsinoma hücre hattı HT-29 ile incelenmiştir. Hücreler DMEM ortamında (4,00 mM L-Glutamin, 4500 mg/L Glikoz, Sodyum Pirüvat içeren) ve % 10 inaktive edilmiş fetal buzağı serumu ilavesi ile büyütülmüştür. Hücreler -196 °C'den canlandırılarak, 3 hafta boyunca büyütüldükten sonra hücreleri 48 sa boyunca %80 konfluent olunca, tutunma deneyi için HT-29 hücreleri antibiyotik içermeyen ortam içerisine 2 ml ilave edilerek kültürlenmiştir. Aynı bir şekilde büyütülmüş LAB hücreleri PBS(pH;7,27) ile iki kez yıkanıp hücre süspansiyonu edilmiştir. 12 kuyucuklu plaka 500 µl besiyeri eklenmiştir. 48 saat sonrasında besiyeri çekilip, Capricorn PBS ile 2 kez yıkandı. Hücreler konsantrasyonu $1,5 \times 10^8$ kob/ml olarak antibiyotik içermeyen DMEM içerisinde süspansiyon edilmiştir. Üzerine 10 µl LAB 10^8 kob/ml besi ortamı ilave edilerek % 5 CO₂ içerisinde 37 ° C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Oluşan tekli tabaka, PBS ile 5 kez yıkanarak ve ardından hücrelere yapışan bakteriler Triton-100X ile elde edilmiştir. Ardından, 10.000 g 'de 5 dakika boyunca santrifüjlenerek, PBS içerisinde süspansiyon edildikten sonra olarak seri seyreltilip MRS plakalarında büyütülmüştür. Bakterilerin canlı sayımları 37 °C'de 48 saat inkübasyondan sonra belirlenmiştir (Livd.,2017). İzolatların HT-29 hücre hattına tutunma oranı aşağıdaki denklem kullanılarak belirlenmiştir;

$$\% Adezyon = \left(\frac{B_1}{B_0} \right) \times 100 \quad (6)$$

B₀: Başlangıç bakteri sayısı kob / mL

B₁: 2 sa sonundaki bakteri sayısı kob / mL

HT-29 hücre hattına bağlanan bakterilerin görsel olarak incelenebilmesi için bazı işlemler uygulanmıştır. Tek tabakadaki HT-29 hücreleri 3 mL PBS (PBS; pH 7,4) ile iki kez yıkandı. 2 mL DMEM ile 12 kuyucuklu plakaya aktarıldı ve 37 °C'de 2 sa inkübe edildi. İnkübasyondan sonra monoleyar tabaka da yapışmayan bakterileri uzaklaştırmak için beş kez steril PBS (pH 7.4) ile yıkanmıştır. 10^9 CFU/ml serumsuz DMEM içinde 1 mL süspansiyon edildi ve 2 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi. LAB hücreleri 3 mL metanol ile sabitlendi ve oda sıcaklığında 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Metanol

uzaklaştırıldıktan sonra hücrelere 3 mL giemsa boyası (PBS içinde giemsa'nın 1/20 oranında seyreltilmiş) eklenerek boyanmış ve 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Boyanın fazlası distile su ile uzaklaştırılmıştır. Plakalar kuruduktan sonra inverted mikroskobu ile incelenmiştir (Sharma ve Singh, 2017).

3.6.2.KLA Üretim Testi

İzolatların KLA üretimi UV spektrofotometrik yöntem ile belirlenmiştir (Torlak, 2016). 2000 µg / mL LA ve farklı konsantrasyonlarda 0, 5, 20 veya 40 mg / ml Tween 80 ilave edilmiştir. MRS sıvı besiyerine 100 µg / ml olarak ilave edilmiştir (EK-5). Gece boyu büyütülen izolatlar % 2 (H/H) oranında inoküle edilmiş ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, örneklerden 1 ml alınıp 6000 g'de 2 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Ardından, süpernatantlara ilk olarak 2 ml izopropanol ilave edilerek vortekslenmiş ve daha sonra 3 ml hekzan ilave edilerek 3 dakika boyunca vortekslenmiştir. Final çözeltisi, 3 dakika boyunca 6000 g'da santrifüjlenmiş ve süpernatantlar KLA analizinde kullanılmıştır. Absorbanslar 233 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede ölçülerek elde edilmiştir (Torlak, 2016).

3.6.3.Ekzopolisakkarit Oluşturma Özelliği

Kültürlerin EPS üretimleri Razack vd. (2013) göz önüne alınarak küçük değişikliklerle belirlenmiştir. Gece boyu büyütülen LAB izolatları 5 ml'lik sıvı besi ortamlarına ikiye paralel olarak %2 oranında inoküle edilmiş, 37 °C'de aerobik koşullarda 48 sa inkübe edilmiştir. Bu amaçla MRS besiyeri içerisindeki %2 glikoz yerine %10 oranında sükroz ilavesi yapılarak deneylerde kullanılmıştır. (EK-3) İnkübasyon sonunda bakteri hücre yüzeylerindeki yapışmış EPS'yi ayırmak için 100 °C su banyosunda 15 dakika bekletilmiştir. Ardından süpernatantlar santrifüj (6000 g'de 10 dakika) işlemiyle ayrılmış ve iki kat hacim %96'lık soğuk etanol ile 4 °C'de 24 sa bekletilerek EPS'ler çöktürülmüştür. Sonrasında santrifüj işlemiyle sıvı kısım uzaklaştırılmış ve oluşan pellet 100 °C' tamamen kuruyana kadar bekletilmiştir. Bakterilerin EPS üretme özellikleri, pelletin kuru ağırlığının ölçülmesiyle kuru EPS ağırlığı g / L olarak ifade edilmiştir (Razack vd., 2013).

3.6.4. Kolesterol Asimilasyon

3.6.4.1. Kolesterol Stok Solüsyonu ve Deney Ortamının Hazırlanması

İzolatların kolesterol asimilasyonu Tok ve Aslım (2010) göz önüne alınarak belirlenmiştir. LAB izolatları MRS içerisinde 37 °C’de gece boyu büyütülmüştür. Kolesterol stok solüsyonu etanol içinde 10 mg/ml olarak hazırlanmıştır. Kolesterol ve safra tuzu 0.45 µm gözenekli filtre yardımı ile ayrı steril edilmiş ve otoklavlanarak steril edilen MRS broth sıvı besiyeri ortamı ile birleştirilmiştir. Deneylerde kullanılan MRS ortamındaki kolesterol konsantrasyonu 100µg/ml, safra tuzu 0,3%(A/H) olarak ayarlanmıştır. Hazırlanan kolesterol ve safra tuzu içeren MRS besi ortamı 5 ml’lik tüplere dağıtılmıştır. İzolatlar kolesterol ve safra tuzu içeren MRS besiyerine % 2 oranında inoküle edilmiş ve 37 °C’de 24 sa inkübe edilmiştir.

3.6.4.2. Kolesterol Miktarındaki Azalma Yüzdesinin Tespiti

100µg/ml kolesterol bulunduran ancak bakteri bulundurmayan ve MRS besi ortamı kontrol olarak ve kolesterol azalma yüzdesi hesaplamalarında kullanılmak üzere deneylere dahil edilmiştir. İzolatlar 5000 g’de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve süpernatant 500 µL alınıp aşağıdaki işlemler gerçekleştirilmiştir.

Örneklerin üzerine 3 mL %95’lik etanol eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Ardından, üzerine 2 mL %50’lik KOH eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Bu karışım 60°C’lik su banyosunda 15 dak ısıtılmış ve soğutulmuştur. Örneklerin üzerine 5 mL hekzan eklenmiş ve 20 sn boyunca vortekslenmiştir. Ardından, üzerine 3 mL distile su eklenerek tekrar karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 15 dakika bekletilerek faz ayırımı sağlanmıştır. Hekzan tabakasından 2,5 ml yeni tüplere transfer dildikten sonra, 60°C’lik su banyosunda tamamen buharlaştırılmıştır. Her bir tüpün üzerine 4 mL o-fitalaldehit reaktifi(0,5 mg o-fitalaldehit /ml asetik asit) eklenmiş ve oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir. Ardından, üzerine 2 ml sülfirik asit ilave edilmiştir. Vorteksleme işleminden sonra, oda sıcaklığında 10 dak bekletilmiştir. Son olarak, 550 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçülerek aşağıdaki denklemden yüzde kolesterol azalma hesaplanmıştır.

$$\text{Kolestrol azalma \%} = \left(100 - \frac{Abs_{örn}}{Abs_{kont}}\right) * 100 \quad (7)$$

Burada,

$Abs_{örn}$ =Bakteri inokulasyonu yapılan örneklerdeki 550 nm’de ölçülen absorbans değeri

Abs_{kont} =Bakteri inokulasyonu yapılmamış örneklerdeki 550 nm’de ölçülen absorbans değeri

3.7. Seçilmiş Suş (S16) İle Beyaz Peynir Üretimi

Peynir Üretiminde Kullanılan Starter Kültürler:

Direkt kullanıma uygun NFC DOSH 602 peynir starter kültürü (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ve *St. thermophilus*) üreticinin önerdiği şekilde 0,2 g tartılarak 2L süt için peynir yapımında kullanılmıştır.

Seçilmiş potansiyel probiyotik Suş (S16) steril yağsız süt tozundan hazırlanmış 13 ml’lik ortama 100 µl transfer edilip 16-18 sa 37 °C’de büyütülmüştür. Yaklaşık 10^8 - 10^9 kob/ml aktif probiyotik kültürü peynir yapımında kullanılmıştır.

Peynir Üretimi:

DeneySEL peynir üretimi Adnan Menderes Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’na ait gıda kimyası laboratuvarında yapılmıştır. Yerel üreticilerden temin edilen süt 2 gruba ayrılarak, aynı sıcaklık-zaman parametreleri ile standart üretim tekniği uygulanarak beyaz peynir (klasik beyaz peynir) üretilmiştir. Gruplar klasik beyaz peynir kontrol grubu (KBK), klasik beyaz peynir deneme grubu (KBE) olarak adlandırılmıştır.

Çiğ süt 72 °C de 2 dakika pastörize edildikten sonra, iki gruba ayrılan süt 37°C’ye soğutularak beyaz peynir teknelerine boşaltılmıştır. Kalsiyum klorür ($CaCl_2$)(klasik beyaz peynir için (20 g /100 ml) , % 0,05 oranında starter kültür ve 1/15000 kuvvetinde peynir mayası ilave edilmiştir (Hayaloglu vd., 2002; Kuleas ve Gu, 2009).

Ticari kültür ilavesi yapılarak sütte pıhtılaşma zamanı istenilen pH aralığına olana kadar devam edildi. Sütteki pH değeri 6.10 ulaştığında peynir mayası ilave edilmiştir. Bu

süre sonunda oluşan pıhtılar 2x2x2 cm boyutlarında kesilerek, peynir altı suyundan ayrılması için 15 dakika kendi halinde bırakıldıktan sonra yaklaşık 3 saat baskıda (20 kg/100 kg) bırakılmıştır. Süre sonunda peynir altı suyunun tamamen uzaklaştırılmasından sonra peynir eşit parçalara ayrılarak 220cc'lik kavanozlara aktarılmıştır. Ardından % 13'lük salamura ilavesi yapılarak oda sıcaklığında 12-18 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra +4 °C'ye alınarak 15 günde bir analizleri yapılmak üzere depolanmıştır(Hayaloglu vd, 2002; Kuleas ve Gu, 2009),

Salamura için beyaz peynir örneklerinin tuzlanmasında %13(A/H)oranında ticari rafine tuz içeren ilave edilmiştir. Peynir mayası için ülkemizde kullanılan Mayasan ticari şirdeni kullanılmıştır.



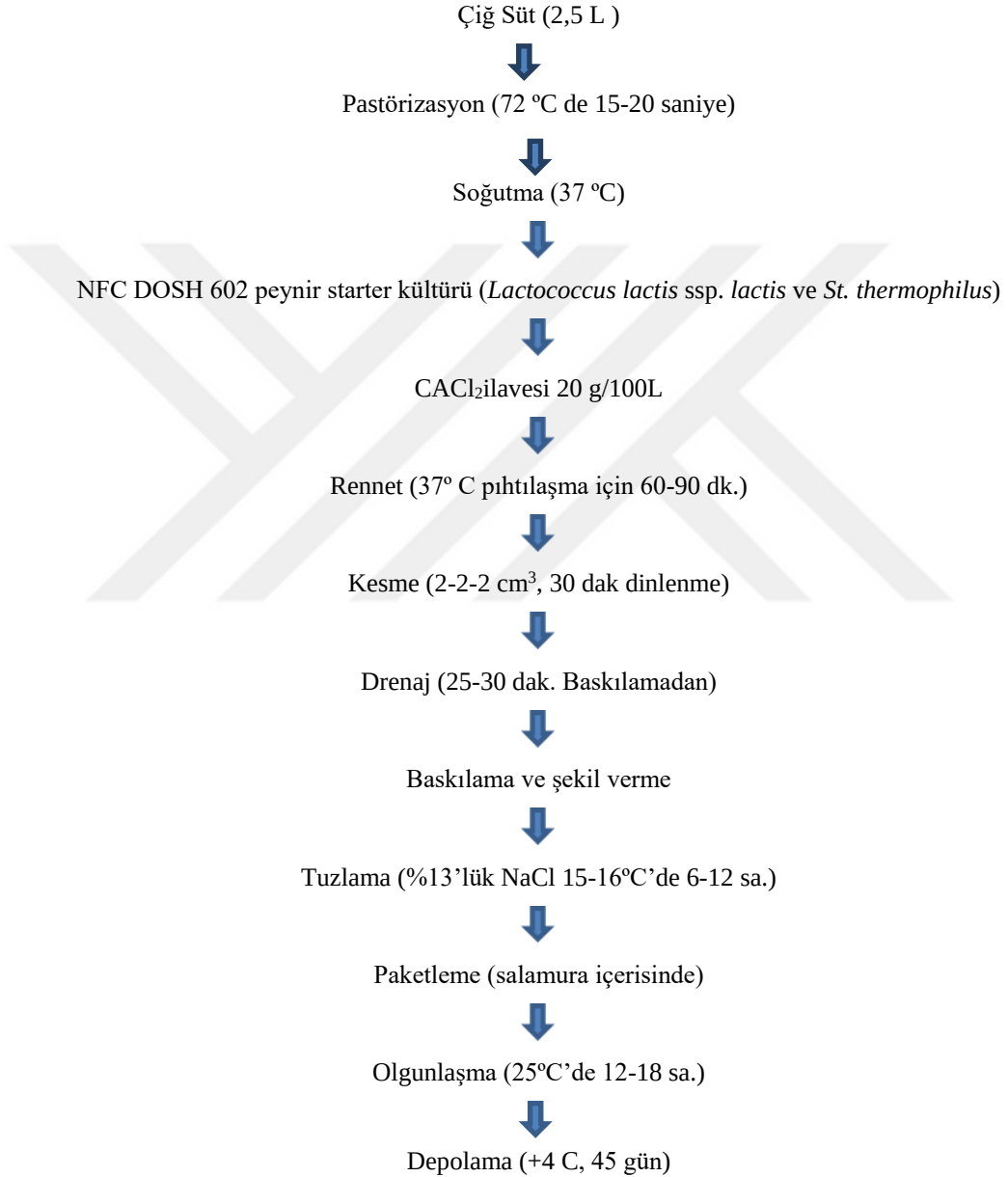
Maya kuvveti ;

$$(2400 \times V) / (t \times v)$$

V : Alınan Süt Miktarı ,ml

T :Pıhtılaşma Süresi ,sn

V : Kullanılan Maya Miktarı ,ml



Şekil 3.1. Laboratuvar ölçekli beyaz peynir üretim akış şeması.

3.8. Peynirde Yapılan Analizler

3.8.1. PH Tayini

Peynir pH tayini 2,5 g peyniri örneği ile saf su behere alınmıştır. Sonra karıştırılarak peynir bulamaç haline gelmesi sağlanmıştır. PH metre kalibre edildikten sonra, karışım behere alınarak Milwaukee Mi150 ph metre ile ölçüm gerçekleştirilmiştir.

3.8.2.Titrasyon Asitliği

Erlenmayere 2,5 g peynir örneği tartılarak ve üzerine 20 ml saf su ilave edilmiş ve baget yardımıyla peynirin ezilmesi sağlanmıştır. Üzerine 2-3 damla fenolfitaleyn çözeltisi ilave edilerek SH büret ile 0,1 N NaOH çözeltisiyle 30 saniye boyunca kaybolmayan açık pembe renk oluşana kadar titrasyon yapılmıştır. Titrasyon bitiminde sarf edilen NaOH miktarı kaydedilmiştir.

$$\% \text{Laktik asit} = \frac{N * F * E * (V1 - V2)}{m} * 100$$

N:Kullanılan NaOH'ın normalitesi (0,1N)

F:0,1 N NaOH faktörü

E:laktik asit miliekivalan ağırlığını (0,09 mEq/L)

V1: titrasyonda peynir için sarf edilen NaOH miktarı (ml)

V2:titrasyonda saf su için sarf edilen NaOH miktarı (ml)

m: peynir miktarı (g)

3.8.3.Kuru Madde Tayini

Çapı en az 5 cm olan düztabanlı kapaklı metal bir kaba 3 g peynir tartılarak ve su banyosunda kısmen kurutulur. Kap 105°C sıcaklıkta vakumlu etüve yerleştirilir. Yaklaşık 4

saat sabit ağırlığa gelen kadar $\leq 100\text{mm Hg}(13,3 \text{ kPa})$ basınç altında kurutulmuştur. Desikatör alınan örnekler soğuduktan sonra tartılmıştır. Ağırlık kaybı % nemi vermektedir.

$$\text{KM} (\%) = (M_2 - M_1) / (M_1 - M_0) \times 100$$

Bu eşitlikte;

KM: % (A/A) veya g olarak toplam kuru madde miktarı

M0: Kurutma kabı, kum ve cam çubuğun ağırlığını, g

M1: Peynir ilavesinden sonra kurutma kabı, kum ve cam çubuğun ağırlığını, g

M2: Kurutma sonrası peynir, kurutma kabı, kum ve cam çubuğun ağırlığın, g ifade etmektedir.

$$\text{Peynirin nem miktarı} (\%) = 100 - \text{KM} (\%)$$

3.8.4. Yağ Tayini

Bütirometre kadehciğine yaklaşık 3 g peynir örneği tartıldıktan sonra bütirometreye sıkıca yerleştirilmiştir. 10 ml 1,82'lik H_2SO_4 ilave edildikten sonra özel tıpa yardımıyla bütirometre kapatılmıştır. Bütirometre 65°C 'deki su banyosuna konulup ve ara sıra karıştırılmıştır. Peynirler tamamen eriyince tıkaç çıkarılarak bütirometreye 1 ml amil alkol ilave edililerek ve hafif bir şekilde çalkalanmıştır. Bütirometrenin skalasını yaklaşık % 40 değerine kadar tekrar H_2SO_4 ilave edilerek tıpayla kapatılmıştır. Bütirometre dikkatli bir şekilde alt üst edilerek iyice karıştırılmıştır ve 65°C 'deki su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra bütirometreler Gerber santrifüjine dengeyi bozmamak için karşılıklı olarak yerleştirilerek ve dakika 1000-1200 devirde 5 dakika santfirüj edilmiştir. %40 'lık bütirometre üzerinde yağ oranının ayrılmış bir şekilde gözlemlenmiştir.

3.8.5. Tuz Tayini

5 g kadar peynir tartılarak $60-70^\circ\text{C}$ sıcaklıktaki suyla havanda veya laboratuvar blenderi ile iyice ezililerek ve üstteki sulu kısım bir balon jojeye alınmıştır. Bu işlem peynirdeki tuzun tamamen suya geçmesi için 5-6 kez tekrarlanmıştır. Balon-jojedeki içerik oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra saf su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır. Balon

içeriği içerisinde süzgeç kağıdı bulunan bir huni yardımıyla başka balona süzölmüştür. Süzöntüden 25 ml erlene alınarak üzerine birkaç damla potasyum kromat ilavesinden sonra kiremit kırmızısı renk oluşuncaya kadar 0,1 N AgNO₃ ile titre edilmiştir. Titrasyon da harcanan AgNO₃ miktarı kaydedilmiştir. Tanık denemde 25 ml süzöntü yerine 25 ml saf su kullanılarak gerçekleştirilmiş ve sarfiyat belirlenmiştir.

$$\text{Tuz miktarı (\%)} = [N \times F \times E (V1 - V2) / m] \times 100$$

N: Kullanılan AgNO₃ normalitesi(0,1N)

F: 0,1 N AgNO₃ çözeltisinin faktörü

E: Sodyum klorürün mililekivalan ağırlığı (0,0585)

V1: Titrasyonda peynir için sarf edilen AgNO₃ miktarı, ml

V2: Titrasyonda saf su için sarf edilen AgNO₃ miktarı, ml

m: Peynir miktarını, g

3.8.6. Peynirde Mikrobiyolojik Analizler

Mikrobiyolojik analiz, peynirlerin olgunlaştırılması ve depolanması sırasında farklı zamanlar aralıklarında(0, 15, 30, 45.gün) gerçekleştirilmiştir. Her testteki canlı hücre sayısını belirlemek için 10 gr beyaz peynir (10 g) aseptik olarak tartılarak,90 mL steril pepton çözeltisi ile karıştırılmıştır. Çözelti daha sonra 9 mL fizyolojik tuzlu su çözeltisi ile seri seyreltilmiştir. Canlı hücre sayımlarının sayımı dökme plak yöntemi kullanılarak 2 paralel olacak şekilde yapılmıştır. Her mikroorganizmatür için seçici ortam üzerine 0,1 mL veya 1 mL olarak uygun seyreltilerle analizler yapılmıştır. Toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı (TBC)Plate Count Agar besiyerinde 37 ° C'de 48 saat inkübe edilerek koloni sayımı gerçekleştirilmiştir. Mezofilik laktik asit bakterileri MRS agar kullanılarak dökme plaka yöntemi ile 37 ° C'de 48 saat boyunca inkübe edilmiştir.Stafilokoklar içinBaird Parker Agar besiyerinde, (yumurta sarısı tellür ilaveli)37 °C'de 48 saat süreyle inkübe edilerek sayım gerçekleştirilmiştir. Maya ve küfler için Patates Dekstroz Agar'da 5-7gün boyunca 30 °C'de inkübasyon sonunda canlısayımı gerçekleştirilmiştir. Enterobacteriaceae, EMB Agar'da37 °C'de 24 saat inkübe edilmiş ve sayımı gerçekleştirilmiştir(Motalebi vd., 2018).

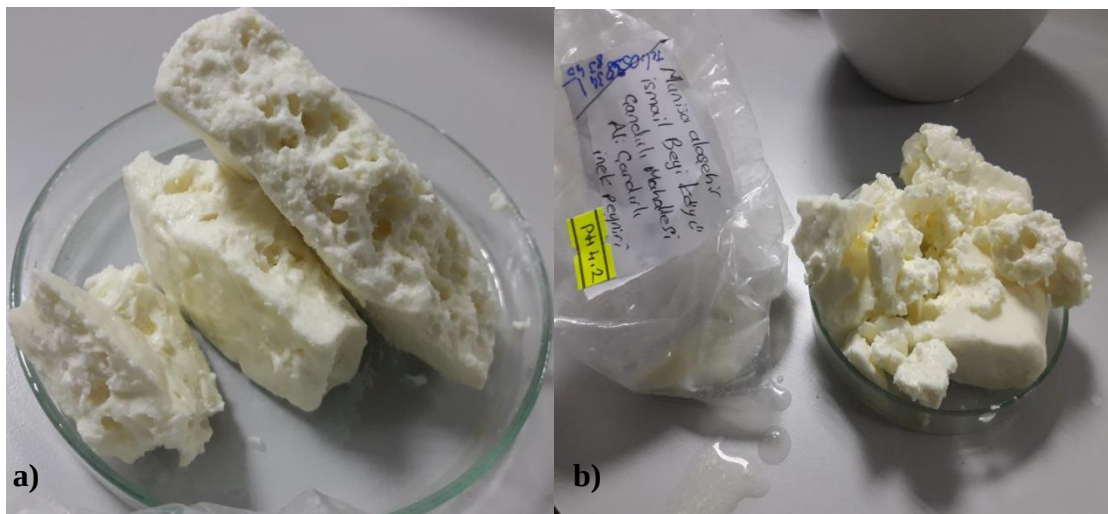
4. BULGULAR

4.1. Peynir Örneklerinin Kimyasal Özellikleri ve LAB Sayımı

Peynir örneklerinin pH değerleri 4,5-5,9 aralığında ölçülmüştür. LAB sayısı ve asitlik arasında herhangi bir korelasyon gözlemlenmemiştir. Peynir örneklerinin canlı LAB sayısı 10^4 kob/g'nin üzerindedir. Elde edilen sonuçlar Yüksel vd. (2021), Hayaloglu vd. (2002) ve Öner ve Sarıdağ (2019) ile benzerlik göstermektedir. Geleneksel peynir üretiminde çiğ süt kullanıyor olması ve spontan fermentasyonla LAB florasının gelişmesi örneklerde ortaya çıkan LAB sayımı farklılıklarını açıklamaktadır.

Çizelge 4.1. Peynir örneklerinin asit özellikleri ve LAB flora yükü.

Peynir Örnekleri	Kod Numarası	Kaynak	pH	SH°	% Laktik Asit	LAB Sayımı (kob/g)
İzmir/Tire	KP	Koyun peyniri	4,8	7,9	0,71	2,8x10 ⁶
Diyarbakır	SB	İnek peyniri	5,2	14	1,26	1x10 ⁶
Manisa/Alaşehir	İP	İnek Peyniri	4,7	9,4	0,84	4x10 ⁵
Manisa/Alaşehir	KOP	Koyun peyniri	4,6	9,4	0,84	1,2x10 ⁴
Manisa/Alaşehir	KEP	Keçi peyniri	4,5	6,9	0,62	1x10 ⁴
Manisa/Alaşehir	ÇBA	Koyun peyniri	5,9	2,7	0,24	4x10 ⁴
Manisa/Alaşehir	ST	Koyun peyniri	5,3	12	1,0	9x10 ⁶



Şekil 4.1. Manisa keçi (a) ve inek (b) peynir örnekleri.

4.2.LAB Saflaştırma

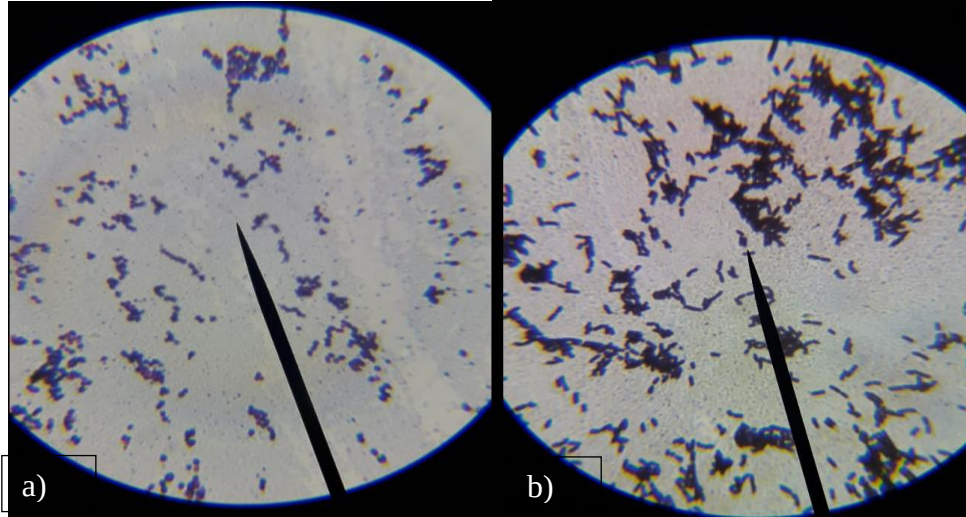
Saflaştırma tek tip koloni elde edilene kadar çizgi plaka yöntemi ile devam ettirilmiştir. Aşağıda temsili seçilen izolatların için koloni morfolojisi çizgi plaka üzerinde görülmektedir(şekil 4.1).



şekil 4.2.Temsili izolatların MRS Agar besisi ortamında çizgi plaka görünümü(SB15 –SB16).

4.3. Gram Boyama ve Katalaz Testi

Başlangıç olarak saflaştırılan 90 adet izolatdan yeterince büyüme göstermeyen ve katalaz pozitif özellik gösterenler çalışmanın dışında bırakılmıştır. 64 izolat Gram boyama neticesinde ışık mikroskopunda incelendiğinde mavi-mor renkte gözlemlenmiş ve Gram pozitif (+) olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca bakteri hücre morfolojileri ışık mikroskopunda kok yada çubuk şeklinde gözlemlenmiştir (şekil 4.2 ve 4.3). Katalaz testi sonucu herhangi bir gaz oluşumu gözlemlenmemiş ve katalaz negatif (-)olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.3. a)Temsili izolatın (kok)Gram boyama ile ışık mikroskobu görüntüsü(ST16)**b)** Temsili izolatın (basil) Gram boyama ile ışık mikroskobu görüntüsü(S17)

4.4.Probiyotik Ön Eleme: pH ve Safra Tuzu Toleransı

Probiyotik mikroorganizmaların aside toleransı sindirim sisteminde canlı kalması ve beklenen sağlık etkilerini göstermesi bakımından en önemli özelliklerdendir. Bu nedenle, çalışmada kullanılan izolatların ön elemesinde kullanılmıştır. Peynir örneklerinden elde edilen LAB izolatları mide asitliğini simüle eden pH 2,5 ortamında değişen düzeylerde canlılık göstermiştir (Çizelge 4.2). İzolatların çoğunda (46/64) 10^6 kob/ml üzerinde canlı sayısı elde edilmiştir.

Vázquez-rodríguez vd. (2018) fermente gıdalardan 17 adet LAB izole etmişler ve bazı suşların asidik koşullarda (pH 2)canlılıklarını koruyamadıklarını bildirmişlerdir. Örneğin,*L. lactis* ssp *lactis* ve *L. casei* gibi bazı suşlar30-45 dakikasonrasında asidik koşullarda (pH 2)yeterince canlılık göstermemişlerdir. Diğer taraftan, *Bifidobacterium* spp. gibi bazı bakteri suşları, büyüme hızları başlangıçta etkilenmiş olsa da depolamanın sonlarına doğru canlılığını korumuştur. Özellikle *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *B. lactis* ve *B. lactis* DSM10140 gibi suşların büyümesinin asit varlığından etkilenmediği vurgulanmıştır. Literatürde çok sayıda çalışmada farklı canlılık oranlarının gözlenmiş olması çalışılan mide asidi değeri, midede kalma süresi, izolatın kaynağı ve çeşidindeki farklılıklarla açıklanabilir. (Azat vd., 2016)

Yapılan ilk çalışmalardan günümüze kadar *in vitro* asit ve safra tuzu toleransı mikroorganizmaların probiyotik potansiyeline sahip olup olmadığını belirlemek için kullanılmaktadır(Chou ve Weimer, 1999). Çünkü probiyotikler faydalı sağlık etkilerini gösterebilmeleri için bağırsağa yeterince canlı sayısında ulaşabilmelidir. Bu nedenle belirli sürelerdeki asit koşullarda canlılıklarını koruyabilmelidir.

Çizelge 4.2. İzolatların mide asidinetoleransı (pH 2,5).

No	İzolat Kodu	t=0 sa Log Canlı Sayısı	t=3 sa Log Canlı Sayısı	Log Azalma	3 Sa Sonunda Canlı Sayısı
1	ST1	10,14	*	*	*
2	ST 2	8,48	6,00	2,48	1 x10 ⁶
3	ST3	9,87	6,60	3,27	4 x10 ⁶
4	ST4	9,92	*	*	*
5	ST5	9,79	6,60	3,19	4 x10 ⁶
6	ST6	10,03	*	*	*
7	ST7	9,70	6,48	3,22	3 x10 ⁶
8	ST8	9,79	6,30	3,49	2 x10 ⁶
9	ST9	9,34	*	*	*
10	ST10	9,34	6,30	3,04	2 x10 ⁶
11	ST11	10,34	*	*	*
12	ST12	9,48	*	*	*
13	ST13	9,48	*	*	*
14	ST14	9,34	*	*	*
15	ST15	10,00	8,41	1,59	255 x10 ⁶
16	ST16	9,51	8,63	0,88	423 x10 ⁶
17	ST 17	9,74	9,61	0,13	4060 x10 ⁶
18	ST 18	9,98	8,26	1,72	183 x10 ⁶
19	ST 19	9,88	8,57	1,30	372 x10 ⁶
20	KP 1	10,09	7,11	2,98	13 x10 ⁶
21	KP 2	10,10	8,41	1,68	260 x10 ⁶
22	KP3	10,18	7,18	3,00	15 x10 ⁶
23	KP 4	9,90	8,19	1,72	154 x10 ⁶
24	KP9	9,60	6,00	3,60	1 x10 ⁶
25	KP 10	9,48	*	*	*
26	KP 12	9,48	6,00	3,48	1 x10 ⁶
27	KP 14	9,78	9,48	0,30	3020x0 ⁶
28	KP 16	9,78	6,48	3,30	3 x10 ⁶
29	KP 19	10,12	6,00	4,12	1 x10 ⁶
30	SB1	9,63	0,00	9,63	*
31	SB2	9,08	4,85	4,23	*
32	SB 3	9,68	6,60	3,08	4 x10 ⁶
33	SB4	8,95	*	*	*
34	SB5	9,15	6,85	2,30	7 x10 ⁶
35	SB 6	9,41	5,30	4,11	*
36	SB7	9,52	5,70	3,82	*
37	SB 8	8,65	*	*	*
38	SB9	9,20	6,78	2,43	6 x10 ⁶
39	SB10	8,51	6,48	2,03	3 x10 ⁶

Çizelge 4.2.İzolatların mide asidine toleransı (pH 2,5) (Devamı).

No	İzolat Kodu	t=0 Anında Canlı Sayısı	t=3 Anında Canlı Sayısı	Log Azalma	3 Sa Sonunda Canlı Sayısı
40	SB 11	9,20	6,70	2,51	5 x10 ⁶
41	SB 12	9,68	7,65	2,03	45 x10 ⁶
42	SB 13	9,34	6,90	2,44	8 x10 ⁶
43	SB 15	9,26	5,95	3,30	0,9 x10 ⁶
44	SB 16	9,11	7,63	1,48	43 x10 ⁶
45	SB 17	9,53	7,23	2,31	16,8 x10 ⁶
46	SB 18	9,20	8,26	0,94	183 x10 ⁶
47	SB 21	9,08	7,04	2,04	11 x10 ⁶
48	SB 22	9,99	7,85	2,15	70 x10 ⁶
49	SB 26	9,41	6,00	3,41	1 x10 ⁶
50	S 16	9,91	7,63	2,28	43 x10 ⁶
50	S 17	9,87	7,04	2,83	11 x10 ⁶
52	S 26	9,11	6,70	2,41	5 x10 ⁶
53	İP 1	8,96	*	*	*
54	İP 2	8,95	7,20	1,75	16 x10 ⁶
55	İP 5	8,38	*	*	*
56	İP 7	9,99	6,78	3,21	6 x10 ⁶
57	İP 11	9,83	*	*	*
58	İP 14	9,89	7,26	2,64	18 x10 ⁶
59	İP 16	10,48	*	*	*
60	Ç 9	9,86	*	*	*
61	Ç 10	10,51	6,30	4,21	2 x10 ⁶
62	Ç11	9,83	7,18	2,66	15 x10 ⁶
63	Ç 18	9,51	7,18	2,33	15 x10 ⁶
64	KOP 4	7,90	*	*	*

(*):İzolatların 10⁻⁵ve 10⁻⁶ dilüsyonlarında bakteri kolonisi gözlemlenmemiştir.

İzolatların çoğu (53/64) %0,3'lük safra tuzu bulunan MRS ortamında 0,60'nın üzerinde safra tuzuna tolerans göstermiştir. Hemen hemen tüm izolatlar için %1'lik safra tuzunda %0,3'e göre daha az safra tuzu tolerans oranı görülmekle birlikte, bazılarında artan safra tuzu varlığında daha iyi büyüme gözlemlenmiştir.%1'lik safra tuzu ortamında 0,26 ile 1,12 oranları arasında değişen safra tuzu toleransı belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Safra tuzları doğal olarak bağırsak ortamında bulunup birçok mikroorganizma üzerine inhibe edici etkisi olabilen maddelerdir. Bağırsaktaki safra tuzu konsantrasyonu bireyden bireye farklılık göstermekle birlikte,pek çok çalışmada %0,3 olarak kabul edilmektedir (Prabhurajeshwar ve Chandrakanth, 2019). Probiyotik izolatların beklenen sağlık etkilerini göstermeleri için safra tuzuna direçli olmaları önemli bir seçim kriteridir.

Prabhurajeshwar ve Chandrakanth (2019) geleneksel süt ürünü olan yoğurt örneklerinden izole 32 adet LAB için probiyotiklik özellikleri analiz etmişlerdir. 13 adet *Lactobacillus* izolatının %0,05-2,5 oranında safra tuzu içerisinde büyüyerek

canlılıkların koruduklarını bildirmişlerdir. İzolatların çoğunda %1 safra tuzunda 37 °C’de 18-24 sa inkübasyon sonrasında 0,3 değeri üzerinde optik yoğunluk düzeyinde iyi büyüme gözlemlenmiştir. Aynı safra tuzu konsantrasyonu (%1 safra tuzu) için çalışmamızda kullanılan izolatların benzer ve bazı durumlarda daha yüksek absorbans değerleri ile iyi safra tuzu toleransı gösterdiği anlaşılmaktadır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. İzolatların safra tuzuna toleransı.

No	İzolat Kodu	Kontrolün Absorbans Değeri	0,3% Safra Tuzu Ortamında Absorbans Değeri	1% Safra Tuzu Ortamında Absorbans Değeri	%0,3 Safra Tuzuna Tolerans Oranı	%1 Safra Tuzuna Tolerans Oranı
1	ST1	0,43	0,27	0,35	0,64	0,81
2	ST2	0,60	0,43	0,38	0,71	0,64
3	ST3	0,77	0,47	0,41	0,62	0,53
4	ST4	0,78	0,23	0,20	0,29	0,26
5	ST5	0,48	0,41	0,35	0,85	0,72
6	ST6	0,47	0,30	0,29	0,65	0,63
7	ST7	0,93	0,46	0,33	0,50	0,36
8	ST8	0,30	0,22	0,39	0,74	1,31
9	ST9	0,75	0,40	0,31	0,54	0,41
10	ST10	0,81	0,24	0,25	0,29	0,31
11	ST11	0,62	1,14	0,68	1,82	1,08
12	ST12	1,20	0,63	0,58	0,53	0,48
13	ST13	1,28	0,72	0,41	0,56	0,32
14	ST14	0,49	1,06	0,54	2,15	1,11
15	ST15	0,43	0,18	0,19	0,43	0,46
16	ST16	0,82	0,77	0,51	0,94	0,63
17	ST 17	0,59	1,11	0,67	1,86	1,12
18	ST 18	0,61	0,37	0,16	0,60	0,26
19	ST 19	1,12	0,59	0,62	0,53	0,56
20	KP 1	1,36	0,75	0,61	0,55	0,45
21	KP 2	1,21	0,69	0,63	0,57	0,52
22	KP3	1,12	0,728	0,56	0,65	0,50
23	KP 4	1,19	0,73	0,58	0,61	0,49
24	KP9	0,40	0,55	0,60	1,38	1,48
25	KP 10	1,22	0,73	0,65	0,60	0,53
26	KP 12	1,11	0,63	0,59	0,57	0,54
27	KP 14	1,2	0,83	0,77	0,68	0,63
28	KP 16	0,70	0,66	0,65	0,95	0,94
29	KP 19	1,18	0,74	0,54	0,63	0,46
30	SB1	0,62	0,66	0,59	1,06	0,95
31	SB2	0,30	0,25	0,22	0,83	0,74
32	SB 3	0,92	0,75	0,82	0,81	0,89
33	SB4	0,47	0,46	0,46	0,98	0,98
34	SB5	0,82	0,74	0,73	0,90	0,89
35	SB 6	0,68	0,567	0,58	0,82	0,84
36	SB7	0,92	0,78	0,835	0,85	0,90
37	SB 8	1,06	0,88	0,94	0,84	0,89
38	SB9	0,52	0,48	0,47	0,94	0,91
39	SB10	0,54	0,28	0,28	0,52	0,52
40	SB 11	0,72	0,43	0,66	0,60	0,91

Çizelge 4.3. İzolatların safra tuzuna toleransı (Devamı).

No	İzolat Kodu	Kontrolün Absorbans Değeri	0,3% Safra Tuzu Ortamında Absorbans Değeri	1% Safra Tuzu Ortamında Absorbans Değeri	%0,3 safra Tuzuna Tolerans Oranı	%1 Safra Tuzuna Tolerans Oranı
41	SB 12	0,89	0,66	0,74	0,74	0,83
42	SB 13	0,55	0,45	0,57	0,81	1,04
43	SB 15	0,58	0,50	0,40	0,86	0,69
44	SB 16	0,87	0,82	0,68	0,95	0,79
45	SB 17	1,03	0,91	0,75	0,88	0,73
46	SB 18	0,74	0,66	0,68	0,89	0,92
47	SB 21	0,91	0,69	0,71	0,75	0,78
48	SB 22	1,33	1,07	1,01	0,80	0,76
49	SB 26	0,97	0,91	0,79	0,94	0,81
50	S 16	0,31	0,2	0,20	0,64	0,65
50	S 17	0,42	0,18	0,34	0,38	0,82
52	S 26	0,47	0,23	0,17	0,50	0,36
53	İP 1	0,33	0,49	0,36	1,50	1,10
54	İP 2	0,58	0,56	0,56	0,97	0,96
55	İP 5	0,93	0,64	0,65	0,69	0,69
56	İP 7	0,34	0,30	0,37	0,87	1,07
57	İP 9	0,39	0,46	0,44	1,17	1,11
58	İP 11	0,60	0,52	0,48	0,87	0,79
59	İP 14	0,49	0,58	0,30	1,17	0,61
60	İP 16	0,90	0,69	0,66	0,77	0,74
61	Ç 9	0,25	0,39	0,34	1,57	1,37
62	Ç 10	0,88	0,612	0,59	0,69	0,67
63	Ç11	0,42	0,457	0,44	1,07	1,05
64	Ç 18	0,311	0,349	0,33	1,12	1,08
65	KOP 4	0,46	0,464	0,41	1,01	0,91

4.5. Başlıca Probiyotik Özellikler

Geleneksel yöntemlerle üretilen peynir örneklerinden izole edilen 64 adet izolattan 15'inin yeterli ve daha iyi düzeyde safra ve aside tolerans gösterdiği bulgulanmıştır. Bu 15 izolatın başlıca diğer probiyotik özelliklerine ilişkin sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

4.5.1. İzolatların Simüle Mide ve Pankreatik Sularına Toleransı

Probiyotik özellikler arasında, simüle edilmiş gastrointestinal sindirim sistemi geçişi seçim kriterleri arasında çok büyük öneme sahiptir. Asit ve safra tuzu toleransına göre seçilmiş izolatların simüle mide ve bağırsak geçişine dayalı sindirim deneyleri sonucunda büyük oranda yüksek canlılık elde edilmiştir (Çizelge 4.4). Sindirim sonrası canlılık değerleri log (kob/ml) olarak 6,45 ile 8,87 arasında tespit edilmiştir. Sadece bir izolat için

(İP2)10⁶kob/ml'nin üzerinde canlılık değeri sağlanmamıştır.Bu izolat mide ve bağırsak enzimlerinden diğerlerine göre daha fazla etkilenmiş olabilir. Ayrıca başlangıç anındaki canlılık değerinin düşük olması da bu sonucun gözlenmesindeki diğer bir neden olabilir.

Plessas vd. (2017)iki ay olgunlaştırılmış Feta tipi beyaz peynirinden izole ettikleri 45 adet LAB suşu için potansiyel probiyotik özellikleri değerlendirmişlerdir.10 adet *Lactobacillus* suşu (K2,K5, K6, K13, K14, K17, K21, K28, K32, K39) ve referans suşu olarak *L. plantarum* ATCC 14917 suşunun pH 2, 3, 4'de simüle mide ve pankreatik sularına toleransını belirlemişlerdir. Seçilen 10 izolattan ikisinin mide asidine yeterince dirençli olmadığı (6 log kob/ml altında) gözlemlenmiştir. Ayrıca, K5 kodlu izolatın *Lb. paracasei* olarak tanımlanan izolatın pepsin pankreatin ve safra tuzu bulunan ortamlarda istenilen canlılık değerlerine sahip olduğu bildirilmiştir. Mide suyunun pH'sı, mideden bağırsağa geçişte probiyotik bakterilerin hayatta kalmasını etkileyen ana faktörler arasında kabul edilmektedir. *L.paracasei*K5 suşu, yüksek asit koşullarında (pH 2) bile referans suşa yakın ve yeterli düzeyde canlılık göstermiştir.

Oldak vd.(2019) Polonya'da geleneksel yöntemlerle üretilmiş Oscypek ve Korycinski peynirlerinden 29 adet LAB izole etmişlerdir. Bu izolatlardan anti-staff aktivitesine göre seçtikleri iki adet suşun mide bağırsak geçişi özelliklerini değerlendirmişlerdir. Seçilen *L. plantarum* suşlarının (Os4 ve Kor14) gastrik koşullarda 2 saatlik inkübasyonundan sonracanlı bakteri sayısının önemli ölçüde azaldığını (4-5log kob/ml), sonraki 3 saatlik bağırsak geçişinde bakteri sayısının stabil kaldığını bildirmişlerdir. Bu çalışma sonucunda elde edilen canlılık oranları bizim çalışma sonuçlarımıza göre daha düşük düzeydedir (Çizelge 4.4). Bu durum çalışmamızda mide bağırsak geçişi için kullanılan izolatların ön eleme ile seçilmiş olması ile açıklanabilir.

Çizelge 4.4.Seçili İzolatların simüle mide bağırsak ortamında canlılığı

No	İzolat Kodu	t=0 Anında Canlılık log (kob/ml)	Mide Geçişi Sonrası Canlılık log (kob/ml)	Bağırsak Geçişi Sonrası Canlılık log (kob/ml)
1	ST 3	8,60	8,58	7,26
2	ST 16	8,95	8,48	6,45
3	ST 17	9,65	9,42	7,83
4	ST 19	8,90	8,48	7,04
5	KP 2	9,76	9,48	7,90
6	KP 4	9,18	9,48	6,48
7	KP 14	9,60	7,18	8,36
8	SB 2	9,38	7,36	6,90
9	SB 17	9,65	9,48	6,85
10	SB 22	10,04	9,48	7,32
11	S16	10,04	9,48	8,60
12	S 17	9,90	9,48	8,87
13	İP 2	8,48	6,90	*
14	İP 9	9,38	8,48	8,30
15	İP 14	9,34	8,48	8,18

(*):İzolatların 10^{-5} , 10^{-6} ve 10^{-7} dilüsyonlarında bakteri kolonisi gözlemlenmemiştir.

4.5.2. Safra Tuzu Hidrolizi

Safra tuzu hidrolizi mikrobiyal detoksifikasyon olarak değerlendirildiğinde probiyotik suşlar için istenilen özellik olarak görülmektedir. Bu özelliğin probiyotiklerin bağırsakta kalma süresini ve genel faydalı etkilerini desteklediği düşünülmektedir. Diğer taraftan dekonjuge safta tuzlarının insan sağlığına olası toksik etkileri olduğuna dair görüşler de bulunmaktadır (Argyri vd., 2013).Safra tuzu toleransı ile safra tuzu hidrolizi arasında pozitif bir ilişkili olmasıyanında safra hidrolizine sahip suşların kullanımı ile toksik ve olası yan etkilerin azalması mümkün olabilmektedir.

Safra tuzuna toleranslı seçilen izolatların tümünün safra tuzunu hidrolize ettiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.5). Bu durum taurodeoksikolik asit içeren MRS üzerinde büyütülen izolatların etrafındaki çökelmeler ve farklı koloni morfolojisi ile anlaşılmaktadır (Şekil 4.4).

Çizelge 4.5.Seçili izolatların safra tuzu hidrolize etme özellikleri.

No	İzolat Kodu	Safra Tuzu Hidrolizi
1	SB 2	kuvvetli
2	ST 3	kuvvetli
3	ST 19	kuvvetli
4	ST 16	kuvvetli
5	ST 17	kuvvetli
6	KP 2	kuvvetli
7	KP4	kuvvetli
8	KP 14	kuvvetli
9	S 16	kuvvetli
10	S 17	kuvvetli
11	SB 17	zayıf
12	SB 22	kuvvetli
13	İP 2	zayıf
14	İP 9	zayıf
15	İP 14	zayıf



Şekil 4.4.Temsili (KP 14) izolatın safra tuzu hidrolizi petri görüntüsü.

4.5.3. Hidrofobisite Testi

Mikroorganizmaların bağırsak epitel hücrelerine yapışma özellikleri probiyotik seçiminde önemli bir kriterdir. Probiyotikler iyi adezyon özelliklerine sahip olduğundazararlı mikroorganizmalarla daha iyi rekabet edebilirler. Hidrofobisite özelliği adezyonda belirleyici faktörlerden biridir. Ksilene adezyonhücre hidrofobisitesini göstermektedir. Diğer taraftan, güçlü elektron alıcısı ve Lewis asit karakterli kloroforma adezyon ve güçlü bazik karakterli ve elektron vericisi etilasetata hücre yüzeyi polaritesi hakkında bilgi vermektedir.(Kos, 2003)

Probiyotik mikroorganizmaların yüzey özellikleri, çeşitli solventlere adezyonları ile incelenmiştir. En yüksek hidrofobisite değerleri sırasıyla ST17(%35,5), S16(%35,09), SB22(%32,56) izolatları için tespit edilmiştir.

Çizelge 4.6. Seçili izolatların Hücre yüzey hidrofobisite özellikleri.

No	İzolat kodu	Etilasetata Tutunma(%)	Kloroforma Tutunma(%)	Ksilene Tutunma(%)
1	SB2	42,6±0,00	82,18±0,04	1,33±0,08
2	ST 3	21,58±0,01	31,34±0,01	0,64±0,02
3	ST 19	20,79±0,05	33,47±0,05	18,82±0,01
4	ST 16	36,83±0,08	46,28±0,07	25,35±0,02
5	ST 17	19,26±0,02	32,69±0,06	35,55±0,04
6	KP 2	63,87±0,27	12,37±0,01	11,33±0,03
7	KP4	26,28±0,14	32,61±0,05	33,12±0,02
8	KP 14	38,44±0,01	31,89±0,02	14,44±0,03
9	S 16	31,11±0,11	50,89±0,02	35,09±0,03
10	S 17	29,83±0,01	63,66±0,10	4,24±0,06
11	SB 17	44±0,04	69,68±0,02	12,6±0,03
12	SB 22	52,34±0,06	43,18±0,09	32,56±0,05
13	İP 2	30,24±0,03	42,51±0,02	1,99±0,09
14	İP 9	22,02±0,04	25,26±0,02	7,82±0,03
15	İP 14	35,64±0,01	31,69±0,01	7,21±0,01

4.5.4.Otoagregasyon

LAB değişen düzeylerde otoagregasyon(%1,72-%85,80) özelliği göstermiştir.Yüksek otoagregasyon bağırsak hücrelerine tutunma ve kolonize olma bakımından istenilen bir durumdur.Aşağıdaki otoagregasyon yüzdeleri 2 sa inkübasyon sonra elde edilen değerlerdir. Daha uzun sürelerde yapılan otoagregasyon deneylerinde daha yüksek oranda çökme olması beklenmektedir. Literatürde, LAB izolatları için farklı çalışmalarda daha yüksek otoagregasyon yüzdeleri daha uzun sürelerde (4-24 saat) yapılan çalışmalarda çoğunlula bildirilmiştir. (Carmen ve Jussi, 2008; Margalho vd., 2021)

Çizelge 4.7.Seçili izolatların otoagregasyon yüzdeleri.

No	İzolat kodu	Otoagregasyon (%)
1	SB 2	8,88±0,01
2	ST 3	6,74±0,02
3	ST 19	2,57±0,05
4	ST 16	70,51±0,01
5	ST 17	29,82±0,02
6	KP 2	1,71±0,05
7	KP4	11,50±0,02
8	KP 14	8,94±0,01
9	S 16	26,93±0,02
10	S 17	29,23±0,00
11	SB 17	85,80±0,01
12	SB 22	6,34±0,08
13	İP 2	30,27±0,00
14	İP 9	27,71±0,02
15	İP 14	22,39±0,02

4.5.5.Antimikrobiyal Aktivitenin Değerlendirilmesi

LAB izolatlarının antimikrobiyal aktiviteleri hemprobiyotik kriterler hemde gıda güvenliği bakımından önemlidir. LAB organik asitler, bakteriyosinler, hidrojenperoksit gibi çeşitli antimikrobiyal maddeler üretmektedirler(Morandi vd., 2020).Gıda kaynaklı patojenlerin süt ve süt ürünlerinde LAB tarafından inhibisyonu probiyotik destek kültürler için istenilen özelliklerden biridir. Ayrıca bağırsak ortamında bu patojenlerin gelişiminin engellenmesi sağlıklı bir mikrofloranın oluşması bakımından önemlidir.

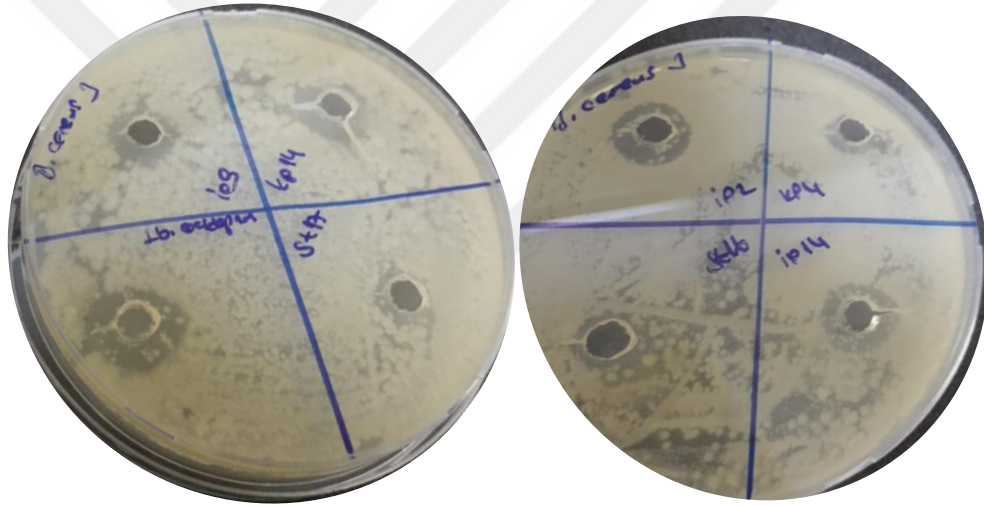
LAB izolatlarının bazı patojen bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği görülmüştür (Çizelge 4.8). İzolatların en fazla *L.monocytegenes* üzerinde etkili olduğu ve en yüksek inhibisyon zonunun 16 mm olarak (S16) ve (İP2) izolatları tarafından gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Sadece iki izolat (ST3 ve ST16) üç patojene karşı inhibisyon etkisi göstermemiştir.

Farklı kaynaklardan izole edilen LAB'nin patojenlere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu pek çok çalışmada bildirilmiştir. Örneğin, yakın zamanlı bir çalışmada,5 sağlıklı yavru domuz dışkılarından izole edilen 30 LAB izolatının çoğu (27'si) için *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella spp.typhimurium*, *Staphylococcus intermedius*, *Staph. chromogenes*, *Proteus mirabillis*, *Areomonas veonii*, *Bordetella bronchioseptica* ve *Klebsiella oxytoca*'a karşı antagonistik aktivite disk metodu ile gözlemlenmiştir (Dowarah vd., 2018)

Son yıllarda yapılan pek çok çalışmada, probiyotiklerin kullanımı patojenlerin doğrudan inhibisyonundan konakçının bağışıklık sistemi fonksiyonlarındaki iyileşmelere kadar geniş bir aralıkta çeşitli sağlık faydaları oluşturduğu bildirilmiştir(Romário vd., 2020).

Çizelge 4.8.Seçili izolatların antimikrobiyal özellikleri (mm).

No	İzolat Kodu	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	<i>E.coli</i> O157H7 NRRL B- 23588	<i>Listeria monocytogenes</i>
1	SB2	10,7	-	13,7
2	ST 3	-	-	-
3	ST 19	-	11,0	11,0
4	ST 16	-	-	-
5	ST 17	14,3	11,0	15,3
6	KP 2	-	-	11,0
7	KP4	10,0	-	13,0
8	KP 14	13,3	14,0	15,0
9	S 16	13,3	11,0	16,0
10	S 17	14,3	11,0	15,0
11	SB 17	-	-	6,0
12	SB 22	10,3	-	12,0
13	İP 2	14,0	13,7	16,0
14	İP 9	13,0	11,0	14,0
15	İP 14	14,3	11,0	14,0



Şekil 4.5.Temsili izolatların *Bacillus cereus* ATCC 11778 patojenine karşı antimikrobiyal aktivitesi (İP2, KP4, İP14, ST16, KP14, İP9, ST17, *Lb. acidophilus*).

4.5.6. Antibiyotik Direnci

Antibiyotik direnç genlerinin varlığı ile ilgili ön bilgi antibiyotik direnç testleri sonucunda sağlanabilir. Probiyotiklerin güvenliği açısından antibiyotik direnci önemli kriterlerden bir tanesidir. Ayrıca, çeşitli antibiyotiklerin varlığında probiyotik suşun davranışı göz önünde bulundurulması gereken diğer bir konudur.

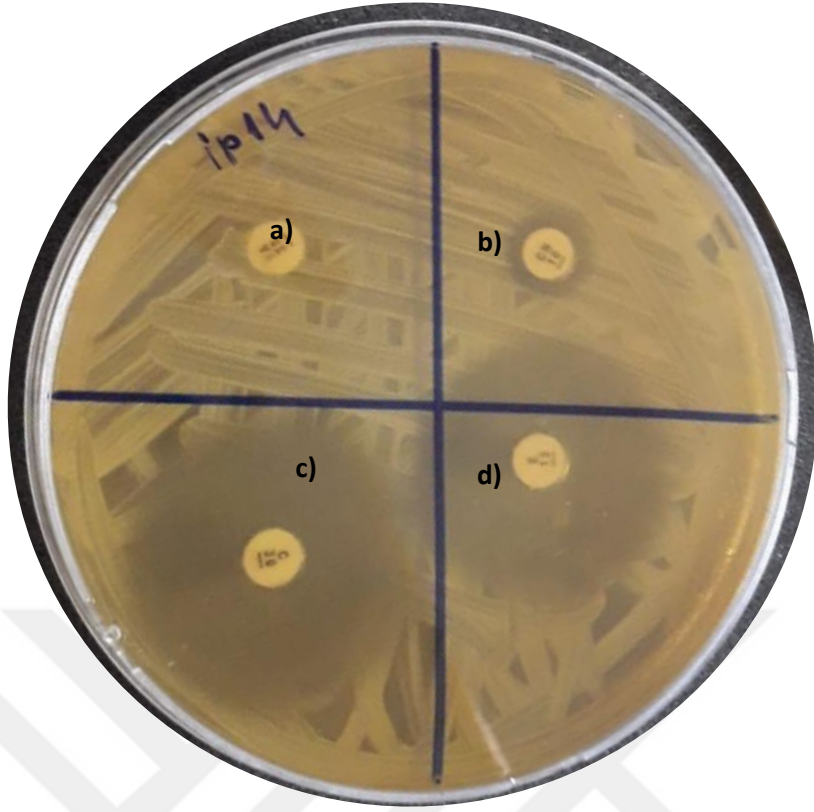
LAB izolatları antibiyotik duyarlılıkları 7 antibiyotik üzerinde araştırılmıştır. Eritromisin, tetrasiklin, ve penisilin antibiyotikleri için izolatların hepsi duyarlı (S) olarak değerlendirilmiştir. İzolatların yarısından fazlası (8/15) gentamisin antibiyotiğine duyarlı bulunmuştur. 5 adet izolatın gentamisine orta düzeyde duyarlıdır. Az sayıda izolat gentamisine dirençlidir(2/15). Kloramfenikol antibiyotiği için izolatların çoğu (11/15) duyarlı olmakla birlikte geri kalan izolatlar (4/15)dirençli bulunmuştur. İzolatların tümü penisilin antibiyotiği için duyarlı katagorisinde değerlendirilmiştir. Tüm izolatların streptomisine karşı dirençli olduğu ve herhangi bir inhibisyon zonu oluşturmadığı gözlenmiştir. Vankomisine izolatların çoğunun (12/15) dirençli olduğu anlaşılmıştır.

Probiyotikler, antibiyotiklere direnç geliştirebilir; örneğin, anne sütünden izole edilen çoğu *Lactobacillus rhamnosus* suşunun, streptomisin, ampisilin, gentamisin ve kanamisin gibi aminoglikozitlere dirençli olduğu gözlemlenmiştir(Shahid vd., 2017).Ancak transfer olabilen antibiyotik direnç genlerinin varlığı güvenlik açısından değerlendirilmelidir.

Çizelge 4.9 Seçili izolatların antibiyotik direnci .

No	İzolat kodu	Eritromisin	Gentamisin	Kloramfenikol	Penisilin	Streptomisin	Tetrasiklin	Vankomisin
1	SB2	26(S)	9(I)	-(R)	33(S)	-(R)	24(S)	-(R)
2	ST 3	13(S)	-(R)	25(S)	34(S)	-(R)	30(S)	17(S)
3	ST 19	28(S)	7(I)	28(S)	32(S)	-(R)	26(S)	-(R)
4	ST 16	11(S)	-(R)	-(R)	30(S)	-(R)	25(S)	20(S)
5	ST 17	27(S)	12(S)	28(S)	20(S)	-(R)	20(S)	-(R)
6	KP 2	25(S)	11(S)	25(S)	27(S)	-(R)	18(S)	-(R)
7	KP4	27(S)	8(I)	28(S)	28(S)	-(R)	25(S)	-(R)
8	KP 14	30(S)	11(S)	28(S)	25(S)	-(R)	22(S)	-(R)
9	S 16	30(S)	8(I)	-(R)	27(S)	-(R)	25(S)	-(R)
10	S 17	25(S)	10(S)	28(S)	22(S)	-(R)	17(S)	-(R)
11	SB 17	17(S)	11(S)	24(S)	32(S)	-(R)	27(S)	18(S)
12	SB 22	17(S)	11(S)	-(R)	17(S)	-(R)	15(S)	-(R)
13	İP 2	25(S)	7(I)	28(S)	20(S)	-(R)	17(S)	-(R)
14	İP 9	10(S)	11(S)	27(S)	26(S)	-(R)	21(S)	-(R)
15	İP 14	12(S)	28(S)	30(S)	25(S)	-(R)	21(S)	-(R)

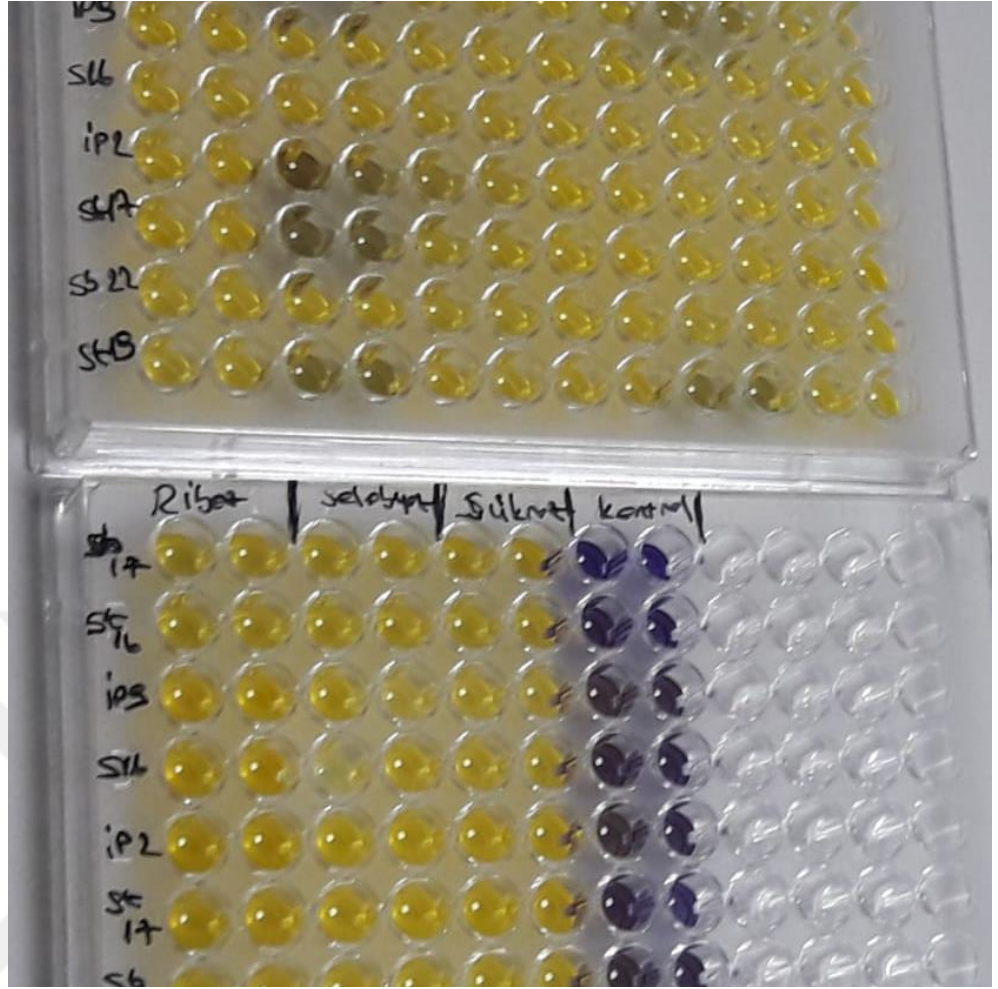
Kloramfenikol (30 µg/disk),Eritromisin (15 µg/disk),Vankomisin (30 µg/disk), Gentamisin (10 µg/disk),Penisilin (10 IU/ disk), Streptomisin (10 µg/disk),;Tetrasiklin (30 µg/disk)Değerler, inhibisyon bölgesinin çapını (mm) temsil eder. İnhibisyon zonu yok: dirençli (R),< 10 mm: orta düzeyde duyarlı(I), 10-35 mm: hassas(S)(Kazancıgil vd., 2019)



Şekil 4.6. Temsili izolatın (İP14) antibiyotik duyarlılığı (a: Vankomisin, b: Gentamisin, c: Kloramfenikol, d: Eritromisin).

4.5.7. Fizyolojik ve Biyokimyasal Karakterizasyon

İzolatların tamamı % 4 tuzda, 15 °C ve 45 °C’de, pH 9,6’da iyi bir şekilde büyüdüğü görülmüştür (Çizelge 4.10). İzolatların çoğu %10 tuzda iyi büyümemiştir. Sadece bazı izolatlar zayıf gelişim göstermiştir (KP2, KP4, KP14). İzolatların büyük bir kısmı arjinini hidrolize etmiştir ancak S16 ve S17 kodlu izolat arjinini hidrolize etmemiştir. Mannitol ve ksiloz haricindeki tüm şekerler izolatların tamamı tarafından fermente edilmiş ve mor rengin asit oluşumu ile birlikte sarıya dönüştüğü gözlemlenmiştir (Şekil 4.7). Fizyolojik ve biyokimyasal test sonuçları bakteriyel tanıda önemli olduğu kadar bakterilerin ileride kullanılacağı ortam ve şartlarda hangi özellikler göstereceği bakımından da değerli bilgiler sunmaktadır.



Şekil 4.7. Seçili izolatların şeker fermentasyonu.

Çizelge 4.10.Fizyolojik ve Biyokimyasal Karakterizasyon.

	ST 3	ST 16	ST 17	ST 19	KP 2	KP 4	KP 14	SB 2	SB17	SB 22	S16	S17	İP 2	İP 9	İP 14
Hücre morfolojisi	kok	kok	basill	basill	basill	basill	basill	kok	kok	basill	basill	basill	basill	basill	basill
4% tuzda büyüme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6,5% tuzda büyüme	+	+	+	zayıf gelişim	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10% tuzda büyüme	-	-	-	-	zayıf gelişim	zayıf gelişim	zayıf gelişim	-	-	-	-	-	-	-	-
15 °C de büyüme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45 °C de büyüme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arjinin hidrolizi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
pH 9,6 da büyüme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D glikoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ksiloz	zayıf gelişim	+	+	+	+	+	+	zayıf gelişim	+	+	+	+	+	+	+
Laktoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	zayıf gelişim	+	zayıf gelişim	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Riboz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Selebiyoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sükroz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

4.6. İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin 16S rRNA ile Tanımlanması

Potansiyel probiyotik özellik gösteren 5 izolatın moleküler tanımlamaları 16S rRNA dizi analizi ile gerçekleştirilmiştir. İzolatların nükleotit dizilimi, tür isimleri ve erişim numaraları aşağıda çizelge 4.11’de belirtilmiştir. Buna göre seçili izolatların *Enterococcus*, *Levilactobacillus* ve *Lactiplantibacillus* cinslerine ait olduğu genetik analizler ile anlaşılmıştır. Bu durum, morfolojik ve biyokimyasal deney sonuçlarının çoğu ile de uyumlu bulunmakla birlikte bazı atipik özelliklerin de varlığını göstermiştir.



Çizelge 4.11. İzolatların 16S rRNA ile tanımlanması.

İzolat Kodu	Nükleotit Dizilimi	Tür İsmi	Erişim Numarası
ST17	ATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCACCTACAATCCGAAGTGAAGAAT GGCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGTTGCGCAACTCGTTGTACCATCCATTGTAG CACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCGATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTC CGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACCAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTGATAATA AGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAAC CATGCACCACCTGTATCCATGTCCCCGAAGGGAACGTCTAATCT CGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAGTGAAGA AGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCAACTCGTTGTACTTCCCATTG TAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCGATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTT CCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTGAATGATGGCAACTAAC AATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGA CAACCATGCACCACCTGTCACCTTTGCCCCGAAGGGAAGCTCTATCTCTA GATTACTAGCGATTCCAACCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGAAGA ACGGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCAGGACTTCGCGACTCGTTGTACCGTCCATTGT AGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCGATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTC CTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACCAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTGATA ATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGAC AACCATGCACCACCTGTCATTCTGTCCCCGAAGGGAACGTCTTATCTCTAAGATTGGCA GAAGA CGATTACTAGCGATTCCAACCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGAAGA AACGGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCAGGACTTTGCGACTCGTTGTACCGTCCATTG TAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCGATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTT CCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACCAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTGAT AATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGA CAACCATGCACCACCTGTCATTCTGTCCCCGAAGGGAACGTCTTATCTCTAAGATTGG CTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGAAGAGAAGC TTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTTGCGACTCGTTGTACTTCCCATTGTAGCAC GTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCGATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGG TTTGTACCCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAATAAGG GTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCAT GCACCACCTGTCACCTTTGCCCCGAAGGGAAGTCTATCTCT	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	OK509839.1
SB22	CGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAGTGAAGA AGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCAACTCGTTGTACTTCCCATTG TAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCGATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTT CCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTGAATGATGGCAACTAAC AATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGA CAACCATGCACCACCTGTCACCTTTGCCCCGAAGGGAAGCTCTATCTCTA GATTACTAGCGATTCCAACCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGAAGA ACGGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCAGGACTTCGCGACTCGTTGTACCGTCCATTGT AGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCGATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTC CTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACCAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTGATA ATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGAC AACCATGCACCACCTGTCATTCTGTCCCCGAAGGGAACGTCTTATCTCTAAGATTGGCA GAAGA CGATTACTAGCGATTCCAACCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGAAGA AACGGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCAGGACTTTGCGACTCGTTGTACCGTCCATTG TAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCGATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTT CCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACCAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTGAT AATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGA CAACCATGCACCACCTGTCATTCTGTCCCCGAAGGGAACGTCTTATCTCTAAGATTGG CTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGAAGAGAAGC TTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTTGCGACTCGTTGTACTTCCCATTGTAGCAC GTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCGATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGG TTTGTACCCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAATAAGG GTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCAT GCACCACCTGTCACCTTTGCCCCGAAGGGAAGTCTATCTCT	<i>Enterococcus sp.</i>	OK392639.1
S16	CGATTACTAGCGATTCCAACCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGAAGA AACGGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCAGGACTTTGCGACTCGTTGTACCGTCCATTG TAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCGATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTT CCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACCAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTGATA ATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGAC AACCATGCACCACCTGTCATTCTGTCCCCGAAGGGAACGTCTTATCTCTAAGATTGGCA GAAGA CGATTACTAGCGATTCCAACCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGAAGA AACGGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCAGGACTTTGCGACTCGTTGTACCGTCCATTG TAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCGATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTT CCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACCAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTGAT AATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGA CAACCATGCACCACCTGTCATTCTGTCCCCGAAGGGAACGTCTTATCTCTAAGATTGG CTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGAAGAGAAGC TTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTTGCGACTCGTTGTACTTCCCATTGTAGCAC GTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCGATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGG TTTGTACCCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAATAAGG GTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCAT GCACCACCTGTCACCTTTGCCCCGAAGGGAAGTCTATCTCT	<i>Levilactobacillus brevis</i>	MT613460.1
KP2	CGATTACTAGCGATTCCAACCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGAAGA AACGGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCAGGACTTTGCGACTCGTTGTACCGTCCATTG TAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCGATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTT CCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACCAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTGAT AATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGA CAACCATGCACCACCTGTCATTCTGTCCCCGAAGGGAACGTCTTATCTCTAAGATTGG CTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGAAGAGAAGC TTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTTGCGACTCGTTGTACTTCCCATTGTAGCAC GTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCGATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGG TTTGTACCCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAATAAGG GTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCAT GCACCACCTGTCACCTTTGCCCCGAAGGGAAGTCTATCTCT	<i>Levilactobacillus brevis</i>	CP031208.1
IP14	CGATTACTAGCGATTCCAACCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGAAGA AACGGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCAGGACTTTGCGACTCGTTGTACCGTCCATTG TAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCGATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTT CCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCACCAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTGAT AATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGA CAACCATGCACCACCTGTCATTCTGTCCCCGAAGGGAACGTCTTATCTCTAAGATTGG CTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGAAGAGAAGC TTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTTGCGACTCGTTGTACTTCCCATTGTAGCAC GTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCGATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGG TTTGTACCCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAATAAGG GTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCAT GCACCACCTGTCACCTTTGCCCCGAAGGGAAGTCTATCTCT	<i>Enterococcus hirae</i>	CP037955.1

4.7. Diğer Probiyotik Özellikler

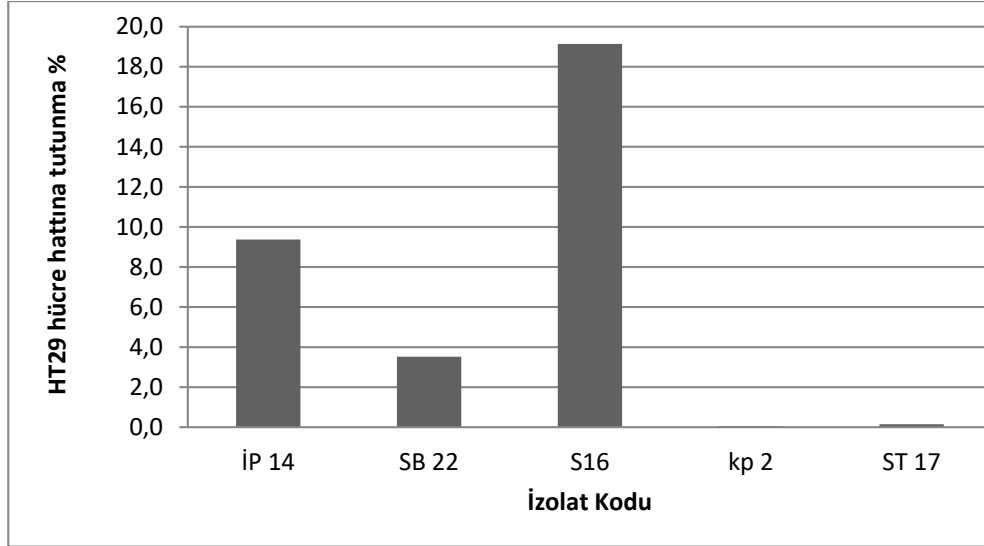
4.7.1. HT-29 Hücre Hattına Tutunma

Probiyotik bakterilerin bağırsak yüzeylerine bağlanması *in vitro* olarak kalma süresini uzatır ve böylece bağırsak immüne sistemini uyarak konakçı sağlığını etkiler. Ayrıca patojen bakterilerin rekabetçi olarak dışarıda tutulması için bir ön koşul olabilir. Çalışmada kullanılan HT-29 epitel hücre hattı olgun enterositlerin morfolojik ve fonksiyonel özelliklerine sahiptir. Bunun yanısıra, normal insan bağırsak epitelindeki çoğu reseptörleri, enzimleri ve taşıyıcı proteinleri eksprese etmektedir (Sharma ve Kanwar, 2018).

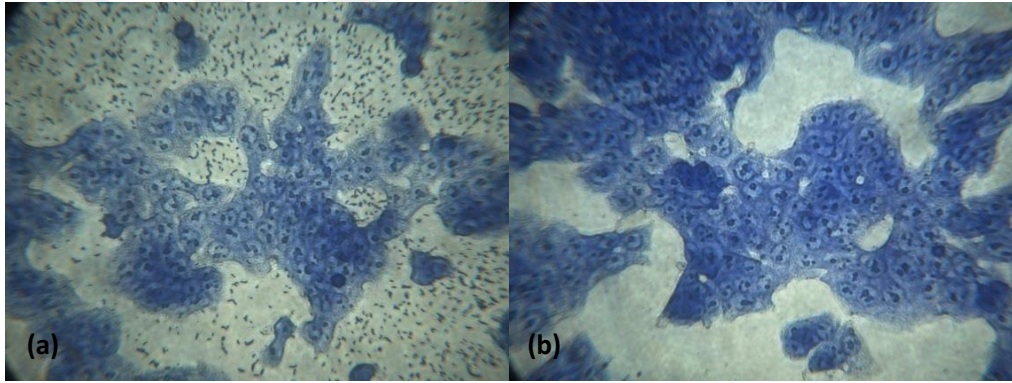
Seçilen potansiyel probiyotik izolatların 5 tanesi değişen düzeylerde HT-29 hücre hattına tutunma göstermiştir (Şekil 4.8). En yüksek adezyon yüzdesi S16 izolatı için % 9,6 olarak tespit edilmiştir. Bağırsak hücrelerine tutunma probiyotik suşlarının kolonizasyon yeteneği bakımından önemli bir parametredir. Bakterilerin yüzey özellikleri ile ilgili görülmektedir. Bakterilerin bağırsak epitel hücrelerine adezyonunda pasif kuvvetler elektrostatik etkileşimler, hidrofobik etkileşimler, sterik kuvvetler ve bazı yüzey moleküllerinin (pili ve lipoteikoik asitler gibi) etkili olduğu bilinmektedir. Bu farklı mekanizmaların etkili olduğu çok faktörlü bir durumu işaret etmektedir. Giemsa boyaması ile boyanmış LAB izolatlarının HT-29 hücre hattına tutunması mikroskopik olarak da inceleme ile tutunması gösterilmiştir (Şekil 4.9). Yapılan yıkamalar sonucunda, 287×10^6 kob/ml bakteri hücresinin HT-29 hücrelerine bağlandığı mikroskop görüntüsü ile de doğrulanmıştır. Bu izolatın yüksek hidrofobisite değeri (ksilene tutunma % 35,09) ile de dikkat çekmektedir.

Son yıllarda yapılan bir çalışmada, fermente gıdalardan izole edilen 11 LAB izolatının Caco-2 ve HT-29 hücre hatlarına adezyon özellikleri incelendiğinde HT-29 hücreleri için % 4,11-12,88 arasında değişen yüzde adezyon değerleri elde edilmiştir. Bu çalışmada *L.rhamnossus* GG referans suşunun en yüksek düzeyde (%13,5) HT-29 hücrelerine bağlandığı gözlemlenmiştir (Sharma ve Singh, 2018).

Yetişkin insan fekal örneklerinden izole edilmiş 13 adet *Lactobacillus* cinsine ait izolatın HT-29 bağırsak hücrelerine adezyon özellikleri belirlenmiş ve en yüksek düzeyde adezyon *Lb. fermentum* 88 (%17,5) olarak bildirilmiştir (Gharbi vd., 2019).



Şekil 4.8.Seçili izolatların HT-29 hatına tutunma özellikleri.



Şekil 4.9. Temsili izolatin (S16) HT-29 hücrelerine tutunması ve giemsa boyası ile inverted mikroskopta(Olympus CK40) görüntüsü a) (S16) ve HT29 hücreleri b) Sadece HT-29 hücreleri.

4.7.2. KLA Üretim Testi

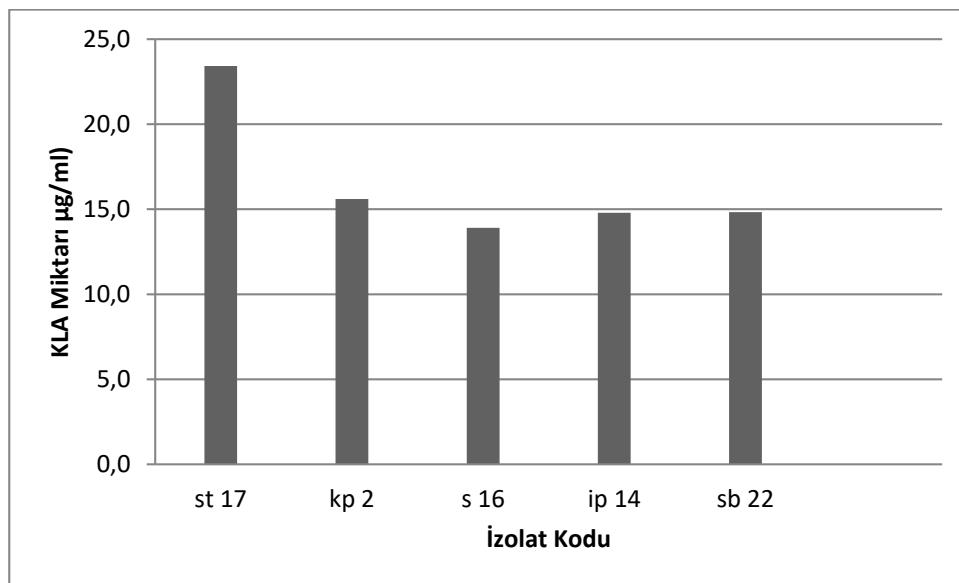
KLA geniş getiren hayvanlarda doğal olarak bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin biyohidrojenasyonu ile elde edilen linoleik asit izomerleridir.KLA, oktadekadienoik asidin konjüge çift bağlarla pozisyon ve geometrik izomerlerinin bir karışımıdır. Anti kanserojen, anti obezite bağıklık sisteminin geliştirici modülasyonu, gibi faydalı sağlık etkileri olduğu bilinmektedir(Gongvd., 2019). Farklı KLA konsantrasyonlarında hazırlanan numunelerin 233 nm'deki absorbans değerleri çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.12.KLA kons. ($\mu\text{g/ml}$) ve 233nm'de absorbens değerleri.

KLA konsantrasyonu($\mu\text{g/ml}$)	Absorbans		ABS (ort.)
0	0	0	0
2,5	0,157	0,158	0,1575
5	0,377	0,382	0,3795
7,5	0,578	0,579	0,5785
10	0,77	0,782	0,776
15	1,186	1,189	1,1875
20	1,566	1,569	1,5675
30	2,296	2,316	2,306

KLA üretim kapasiteleri, spektrofotometrik yöntem kullanılarak 233 nm'de ölçülmüştür. Kalibrasyon eğrisindeki ölçülen değerlerin karşılaştırılmasıyla KLA üretim miktarlarına ulaşılmıştır (EK-5). Kültür süpernatantlarında bulunan toplam KLA konsantrasyonu, 23,42 ila 13,9 $\mu\text{g/ml}$ arasında gözlemlenmiştir. Test edilen suşların çoğu 13,90 $\mu\text{g/ml}$ 'den fazla KLA üretimi bulgulanmıştır. Seçili izolatlar içerisinde KLA üretim kapasitesi en yüksek 23,42 $\mu\text{g/ml}$ (St17) izolatı olmuştur (Şekil 4.10).

Renes vd.(2017)linoleik asit ilave edilmiş(0,5 mg/ml) MRS broth ortamında 6 adet *Lactobacillus* cinsine ait izolatın KLA üretme özelliklerini incelemişlerdir. 37°C'de 48 saat inkübasyon sonrasında 20,06-55,07 $\mu\text{g/ml}$ arasında toplam KLA ürettiklerini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada bizim çalışmamıza göre daha yüksek oranda KLA üretim oranının tespit edilmiş olması LAB izolatının türü, suş farklılığı ve KLA tespit yönteminin farklı olması ile açıklanabilir.



Şekil 4.10. Seçili izolatların KLA üretme özellikleri ($\mu\text{g/ml}$).

4.7.3. Ekzapolisakkarit Oluşturma Özelliği

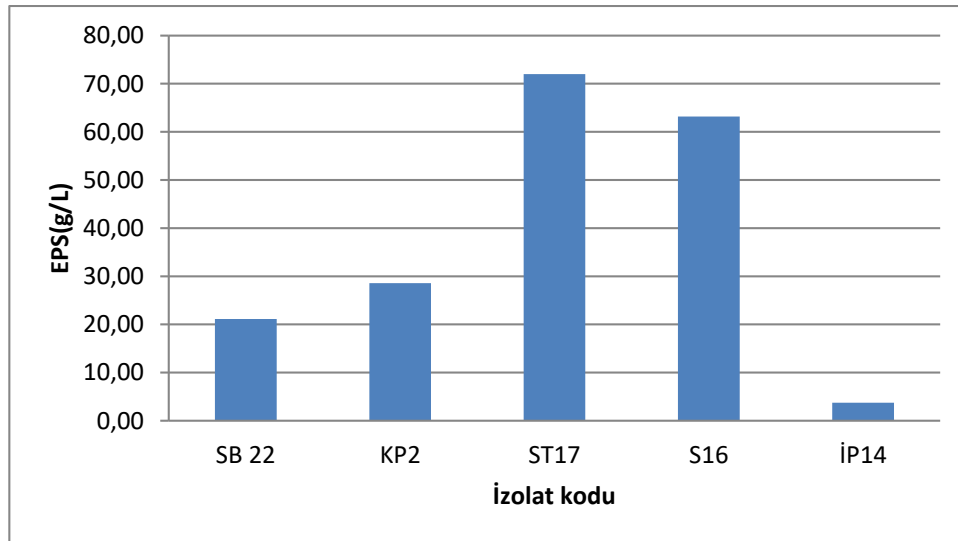
EPS'ler mikroorganizmalarının gelişmeleri boyunca sentezlenen ve dış ortama salınan hücre dışı biyopolimerdir. Bakteri-konak ilişkisi, stres direnci ve mide bağırsak mukozasındaki kolonizasyonundaki katkıları ile probiyotiklik özelliğini desteklerler. Böylece patojen mikroorganizmaların baskılanmasına yardımcı olurlar ve bu durum EPS üreten mikroorganizmayı aynı zamanda dış etkenlerden korur. Ayrıca EPS'ler özellikle biyolojik antioksidan antikanser, antiviral kolesterol düşürücü etkileri ile de karakterize edilebilirler(Alevd., 2020).

Seçili LAB izolatlarının EPS üretim miktarları 3,75-25,5g/L arasında bulunmuştur. En yüksek EPS üretimi 25,5 olarak ST 17 izolatında tespit edilirken en düşük EPS üretimi İP 14 gözlemlenmiştir.

Benzer şekilde tulum peynirinden izole edilen 9 Enterokok izolatının 217,26-323,15 µg/ml oranında EPS ürettiği tespit edilmiştir(Ozkan ve Demirci, 2021b).

Çizelge 4.13.Seçili izolatların EPS üretimleri (g/L).

No	İzolat kodu	EPS(g/L)
1	SB 22	7,5
2	KP2	18,7
3	ST17	25,5
4	S16	24,0
5	İP14	3,75



Şekil 4.11.Seçili izolatların EPS üretimleri (g/L).

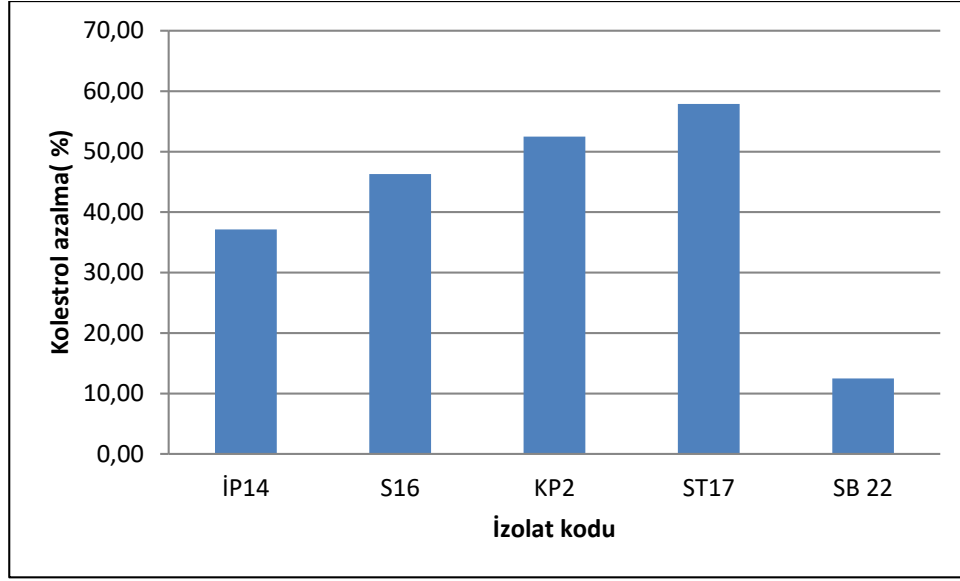
4.7.4. Kolestrol Asimilasyon

Hiperkolesterolemi (yüksek kan kolesterol düzeyi) kronik kalp hastalıklarının gelişmesinde başlıca risk faktörlerindendir. Bu nedenle serum kolesterol düzeylerinin düşürülmesi önemlidir. LAB izolatlarının kolesterol düşürme yeteneği *in vitro* olarak tespit edilmiştir. Bütün LAB kolesterol uzaklaştırma yeteneği göstermiştir. Seçili LAB izolatlarının kolesterol azaltma yüzdesi %12,50-57,89 arasında bulunmuştur(Şekil 4.12). En yüksek kolesterol azaltma yüzdesi 57,89 olarak ST17 izolatında tespit edilirken en düşük kolesterol azaltma yüzdesi 12,50 (SB22) gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, ülkemizde geleneksel olarak üretilmiş tulum peynirlerden izole edilmiş 9 enterokok izolatının %6,59-48,49 oranlarında kolesterol uzaklaştırma yeteneğinin olduğu bildirilmiştir (Ozkan ve Demirci, 2021b).

Yine yakın zamanlarda yapılan başka bir çalışmada farklı kaynaklardan (peynir meyve çeşitleri vb. turşu) LAB izole edilmiş ve kolesterol asimile etme özellikleri incelenmiştir. Peynirden izole edilen bütün *Lactobacillus* cinsine ait izolatlar, %30'ün üzerinde kolesterol uzaklaştırma yeteneği göstermiştir (Alp ve Kuleaşan, 2019).

Çizelge 4.14.Seçili izolatların Kolesterol azaltıcı/uzaklaştırma yüzdesi.

No	İzolat kodu	Kolesterol azalma(%)
1	İP14	37,13±0,05
2	S16	46,31±0,01
3	KP2	52,50±0,01
4	ST17	57,89±0,01
5	SB 22	12,50±0,00



Şekil4.12. Seçili izolatların Kolesterol azaltıcı/uzaklaştırma yüzdesi.

4.8. Seçilmiş Suş (S16) İle Beyaz Peynir Üretimi

TS591(1995) minimum kuru madde 40g/100g ve kuru maddede tuz oranı %10' nu geçmemesi belirtilmiştir. Kontrol ve probiyotik peynirlerin kimyasal kompozisyonu Çizelge 4.15'de belirtilmiştir. Kontrol peynirinin probiyotik peynire göre asitlik düzeyinin olgunlaşma boyunca daha yüksek olduğu görülmüştür. Kontrol peynirinde kullanılan ticari starter kültür hızlı asit oluşumundan sorumlu olmakla birlikte probiyotik peynirde starter kültürün etkisi probiyotik izolatın varlığı ile az da olsa azalmış görülmektedir. Yağ oranları % 14,5-17,13 arasında gözlenmiştir. Az yağlı beyaz peynir kategorisinde sınıflandırılabilir. Kuru madde % 39,14±6,59-28,14±2,65 arasında bulunmuştur. Olgunlaşma sürecinde salamuradan peynir ortamına gerçekleşen difüzyonla tuz oranının beklenildiği gibi arttığı görülmüştür. Peynirdeki tuz oranı zaman içerisinde değişim göstermekle birlikte 45 gün sonra beyaz peynir standardında belirtilen maksimum değerin üzerinde (%7,5) olduğu bulgulanmıştır(TDK,2015).



Şekil 4.13. Laboratuvar ölçekli beyaz peynir üretimine ilişkin görseller.

Çizelge 4.15. Seçilmiş izolat (S16) ile üretilen beyaz peynirin kimyasal analizleri.

No	Peynir	Olgunlaşma Zamanı (Günler)	pH	Laktit Asit (g/L)ve ya (%)	Yağ (%)	Kuru Madde (%)	Tuz	Kuru Maddede Yağ (%)	Kuru Maddede Tuz (%)
1	Kontrol	1	5,30±0,30	0,82±0,12	14,5±2,61	34,23±3,80	4,60±3,71	42,35	13,45
2	Probiyotik	1	5,42±0,32	1,17±0,56	16,55±3,82	39,14±6,59	5,74±4,40	42,28	14,68
3	Kontrol	15	5,17±0,24	0,73±0,09	17,13±1,93	38,8±10,83	10,02±1,26	44,07	25,79
4	Probiyotik	15	5,54±0,19	0,67±0,01	14,63±3,27	37,6±11,49	7,46±1,76	38,84	19,82
5	Kontrol	30	5,05±0,28	0,47±0,02	14,5±3,51	29,26±2,95	10,41±1,18	49,55	35,57
6	Probiyotik	30	5,40±0,19	0,54±0,03	13,75±0,96	28,67±2,19	10,29±1,22	47,96	35,90
7	Kontrol	45	5,29±0,01	0,51±0,02	22,50±0,71	29,26±2,95	10,41±1,18	76,89	35,57
8	Probiyotik	45	5,57±0,01	0,47±0,02	17,50±0,71	28,14±2,65	10,29±1,22	62,18	36,57

Probiyotik ilaveli ve ilavesiz (kontrol) olarak üretilen beyaz peynirdeki olgunlaşma süreci boyunca başlıca mikroorganizma grupları çizelge 4.16'da sunulmuştur. Tüm olgunlaşma sürecinde LAB sayımının mikrobiyal gruplar içerisinde en yüksek düzeyde olduğu gözlemlenmiştir, kontrol ve probiyotik peynir için mikrobiyal sayımlar çoğunda bir fark görülmemiştir. Ancak, başlangıçta (1.gün) maya ve küf sayısı probiyotik peynirde kontrole göre daha az olduğu bulgulanmıştır. Koliform ve Stafilokok sayısı 15 gün sonra, başlangıca göre arttığı gözlemlenmiştir. Toplam canlı sayısı log 6,73-7,63 kob/g arasında değişmektedir. Peynir üretiminde benzer sonuçlar pek çok araştırmacı tarafından LAB sayımı, toplam canlı sayımı, koliform sayımı, maya ve küf sayımı için elde edilmiştir (Öner ve Sarıdağ, 2019; Angelopoulou vd., 2017; Kuleas ve Gu, 2009).

Ancak az sayıda çalışmada koliform ve stafilokok sayısının benzer şekilde yüksek olduğu bildirilmiştir (Rhoades vd., 2021). Bu durum kullanılan sütün bakteri yoğunluğunun olduğunu herhangi bir kontaminasyon olabileceğini düşündürmüştür.

Çizelge 4.16.Seçilmiş izolat (S16) ile üretilen beyaz peynirin mikrobiyolojik analizleri.

No	Peynir	Olgunlaşma Zaman (gün)	LAB Sayımı log(kob/g)	Toplam Canlı Sayımı log(kob/g)	Koliform Sayısı log(kob/g)	Stafilokok Sayısı log(kob/g)	Maya Küf Sayısı log(kob/g)
1	Kontrol	1	9,22±0,03	7,22±0,20	1,99±0,08	2,11±0,08	6,29±0,16
2	Probiyotik	1	9,18±0,03	7,37±0,06	*	2,18±0,22	4,83±0,55
3	Kontrol	15	10,44±0,04	6,73±0,72	6,16±0,44	4,90±0,09	5,81±1,52
4	Probiyotik	15	10,19±0,21	7,63±1,57	6,31±0,32	5,06±1,08	6,56±0,40
5	Kontrol	30	*	8,37±0,04	6,50±0,08	4,54±0,34	5,97±0,03
6	Probiyotik	30	8,23±0,07	7,70±0,08	6,21±0,02	5,02±0,09	6,10±0,01
7	Kontrol	45	**	7,91 ±0,11	6,11±0,01	***	5,85±0,07
8	Probiyotik	45	**	7,33±0,1	5,95±0,05	***	5,90±0,06

(*): 10^{-6} 10^{-7} , 10^{-8} dilüsyonlarında sayılamıyacak kadar çok (>300) koloni varlığı gözlemlenmiştir.

(**): Belirlenemedi.

(***): 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} dilüsyonlarında koloni gözlenmemiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Geleneksel yöntemlerle üretilmiş yedi adet peynirden 90 adet izolat elde edilmiş ve çizgi plaka ile saflaştırılmıştır. Süreç boyunca katalaz pozitif özellik gösteren ve yeterli düzeyde büyüme göstermeyen isolatlar elimine edilmiştir. Böylece, 64 LAB izolatı elde edilmiş ve uzun süreli muhafazaları sağlanmıştır.

Mide asidi ve safra tuzu toleransı sonuçları bu isolatların mide asitliğinden büyük ölçüde etkilendiği ve değişen düzeylerde canlılıklarını kayb ettikleri belirlenmiştir. 46 adet izolatin 10^6 kob/ml üzerinde canlılık göstermiş olması ile birlikte, seçilen 15 izolatin aside büyük ölçüde dirençli ve çoğunlukla 10^7 kob/ml üzerinde canlılık ile birlikte %1 safra tuzu bulunduran ortamda da 0,49 ile 1,12 oranlarında toleransa sahip olduğu ve çoğalabildiği belirlenmiştir.

Seçilen 15 adet izolatin ilgili enzimleri de içeren simüle mide bağırsak geçişi deneyleri sonucunda çoğunlukla 10^6 ve 10^7 kob/ml üzerinde canlılıklarını korudukları, sadece 1 izolatin (İP 2) istenilen düzeyin altında canlılık gösterdiği belirlenmiştir. Bu izolatin mide ve bağırsak ortamındaki enzimlerin varlığından daha fazla olumsuz etkilenmiş olabileceği anlaşılmıştır. Bu 15 izolat, başlıca diğer probiyotik özellikler bakımından değerlendirilmiştir. Bunların çoğu safra tuzunun kuvvetli şekilde hidrolize etmiştir. Çeşitli solventlere (etil asetat, kloroform, ksilen) tutunma ve otoagregasyon özellikleri ile bağırsak hücrelerine tutunabilme ile ilgili bilgilere ulaşılmıştır. Ayrıca, farklı patojen bakteriler üzerine inhibe edici etkileri de probiyotik olarak istenilen bir özellik olmakla birlikte, özellikle *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 suşunu büyük ölçüde engellendikleri tespit edilmiştir. Bu isolatların 11 adedinin basil şeklinde olduğu ve homofermentatif karakterde *Lactobacillus* cinsine ait olduğu, 4 adet izolatin ise kok şeklinde ve diğer fizyolojik, biyokimyasal testler ile *Enterococcus* cinsine ait olduğu düşünülmektedir.

Potansiyel probiyotik özellik gösteren 5 izolatin moleküler tanımlamaları 16S rRNA dizi analizleri hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Buna göre seçili isolatların *Enterococcus*, *Levilactobacillus* ve *Lactiplantibacillus* cinslerine ait olduğu genetik analizler ile anlaşılmıştır. İzolatların tür isimleri ve erişim numaraları sırasıyla; ST17 kodlu izolat (*Lactiplantibacillus plantarum*, OK509839), SB22 kodlu izolat (*Enterococcus* spp., OK392639), S16 kodlu izolat (*Levilactobacillus brevis*, MT613460), KP2 kodlu izolat

(*Levilactobacillus brevis*, CP031208), İP14 kodlu izolat (*Enterococcus hirae*, CP037955) olarak bulgulanmıştır. Bu durum, morfolojik ve çoğu biyokimyasal incelemelerle uyumlu olmakla birlikte bazı atipik özelliklerin de ortaya çıkabildiğini de göstermiştir.

15 adet izolat arasından seçilen 5 izolat için, daha spesifik probiyotik özellikler değerlendirilmiştir. Bağırsak epitel hücrelerine tutunma deneyi sonuçlarında, 3 izolatın (SB22, S16 ve KP2) 10^6 kob/ml üzeri bakteri hücresi ile HT-29 epitel hücre hattına bağlandığı tespit edilmiştir. S16 kodlu homofermentatif özellikteki *Lactobacillus* izolatı % 19,13 bağlanma yüzdesi ile en yüksek tutunma özelliği göstermiştir. Hücre kültürü deneyleri ile bağırsak hücrelerine yüksek oranda bağlandığı tespit edilen probiyotik suş diğer özellikleri ile de sağlığa faydalı etkiler oluşturabilir. Bu 5 izolat, diğer spesifik özelliklerden kolesterol azaltıcı, KLA ve EPS üretimi bakımından da dikkat çekicidir. Bu izolatlardan S16 kodlu *Lactobacillus* izolatı epitel hücreye en yüksek oranda (%19,13), bağlanmış, %46,31 oranında kolesterol azaltıcı etki göstermiş, 13,91 µg/ml olarak KLA ve 63,19 mg/L olarak EPS üretimi ile beyaz peynir üretiminde destek probiyotik suş olarak kullanılmıştır.

Bu izolatla gerçekleştirilen probiyotik peynir denemelerinde kontrole göre asit oluşturma özelliği az da olsa düşük olmakla birlikte peynir fermentasyonu ortamını olumsuz yönde etkilemediği görülmüştür. İleride probiyotik adaylar için yapılan moleküler tanı ile güvenlik kriterlerinin değerlendirilmesinden sonra probiyotik beyaz peynir üretiminde duyu analizlerin planlanması düşünülmektedir.

Bu çalışmanın sonucunda, farklı probiyotik özellikleri ile öne çıkan diğer izolatlarında probiyotik beyaz peynir üretiminde gelecekte kullanılabilmesi beklenmektedir. İlave edilen probiyotik izolatın olgunlaşma boyunca canlılığı ileri moleküler yöntemlerle izlenmesi önerilmektedir. Çalışma sonucunda tür düzeyinde tanımlanması yapılan potansiyel probiyotik izolatları diğer süt ve süt ürünlerinin üretiminde de destek kültür olarak kullanılmasında gelecekteki çalışmaların konusu olabilir.

KAYNAKLAR

- Albayrak, Ç. B., ve Duran, M. (2021a). Isolation and characterization of aroma producing lactic acid bacteria from artisanal white cheese for multifunctional properties. *LWT*,150(June), 112053. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112053>
- Albayrak, Ç. B., ve Duran, M. (2021b). Worldwide research tendencies on probiotics in food science: 1993 to 2021. *British Food Journal*.<https://doi.org/10.1108/BFJ-03-2021-0225>
- Ale, E. C., Rojas, M. F., Reinheimer, J. A., ve Binetti, A. G. (2020). Lactobacillus fermentum : Could EPS production ability be responsible for functional properties ? *Journal of Food Microbiology*,90(June 2019), 103465. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103465>
- Alp, D. (2018). *Doğal Kaynaklardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması Ve İn Vitro Bağırsak Modelinde Patojenlerin Tutunmasını Engelleme Özelliklerinin Belirlenmesi*.SDÜ Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Alp, D, ve Kuleaşan, H. (2019). Farklı Kaynaklardan İzole Edilmiş Laktik Asit Bakterilerinin Ekzopolisakkarit Üretimi ve Kolesterol Asimilasyon Yeteneklerinin Belirlenmesi. *Gıda / The Journal Of Food*, 191–201. <https://doi.org/10.15237/gida.gd18059>
- Angelopoulou, A., Alexandraki, V., Georgalaki, M., Anastasiou, R., Manolopoulou, E., & Papadimitriou, K. (2017). Production of probiotic Feta cheese using *Propionibacterium freudenreichii* subsp . *shermanii* as adjunct. 66, 135–139. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.11.011>
- Ashraf, R., ve Shah, N. P. (2011). *International Journal of Food Microbiology* Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp . *bulgaricus* , *Streptococcus thermophilus* , *Lactobacillus acidophilus* , *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp . in yoghurt — A re. *International Journal of Food Microbiology*, 149(3), 194–208. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.008>

- Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z., ve Tassou, C. C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiology*, 33(2), 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.005>
- Azat, R., Liu, Y., Li, W., ve Kayir, A. (2016). Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented Xinjiang cheese .17(8), 597–609.
- Bao, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, S., Dong, X., ... Zhang, H. (2010). Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control*, 21(5), 695–701. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.10.010>
- Beatriz, A., Teodoro, J. A., Luana, D. P., Silva, F., Dimitrov, S., Bernadette, T., ... Lu, A. (2014). Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Water-Buffered Mozzarella Cheese. 141–156. <https://doi.org/10.1007/s12602-014-9166-2>
- Bosch, M., Fuentes, M. C., Audivert, S., Bonachera, M. A., Peiró, S., ve Cuñé, J. (2014). *Lactobacillus plantarum* CECT 7527, 7528 and 7529: Probiotic candidates to reduce cholesterol levels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(4), 803–809. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6467>
- Bulut Ç.,(2003). *Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria from cheese*. MS Thesis, IZTECH, İzmir, Türkiye
- Caggia, C., Angelis, M. De, Pitino, I., Pino, A., ve Randazzo, C. L. (2015). Probiotic features of *Lactobacillus* strains isolated from Ragusano and Pecorino Siciliano cheeses. *Food Microbiology*, 50, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.03.010>
- Callaghan, A. O., ve Sinderen, D. Van. (2016). Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. 7(June). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00925>
- Carmen , M. ,Merilioto, J., Salminen, S.(2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology* volume 226, pages1065–1073
- Çelik, Ş., ve Uysal, Ş. (2009). Beyaz Peynirin Bileşim , Kalite , Mikroflora ve Olgunlaşması. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*40(1), 141–151.

- Chou, L., ve Weimer, B. (1999). Isolation and Characterization of Acid- and Bile-Tolerant Isolates from Strains of *Lactobacillus acidophilus* 1. *Journal of Dairy Science*, 82(1), 23–31. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75204-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75204-5)
- Demir, E., Kılıç, G. B., ve Özbacı, D. (2019). *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology* Biosafety Assessment of Probiotics “ Probiotics ” Probiyotiklerin Biyogüvenilirlik Özellikleri “ Probiyotikler .” 7(4), 639–645.
- Doğan, M. (2011). Probiyotik bakterilerin etki mekanizması . *Anadolu Bil Meslek Yüksekokulu Dergisi*, (21), 98-104. Retrieved from <https://dergipark.org.tr/tr/pub/abmyoder/issue/46485/583800>
- Dowarah, R., Verma, A. K., Agarwal, N., ve Singh, P. (2018). Selection and characterization of probiotic lactic acid bacteria and its impact on growth , nutrient digestibility , health and antioxidant status in weaned piglets.
- Ehsani, A., Hashemi, M., Afshari, A., ve Aminzare, M. (2018). Probiotic white cheese production using coculture with *Lactobacillus* species isolated from traditional cheeses. 11, 726–730. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.726-730>
- FAO, & WHO, (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food (2002), pp. 1-11
- Flore, R., ve Santoliquido, A. (2009). Antibiotic therapy in small intestinal bacterial overgrowth : rifaximin versus metronidazole. 111–116.
- Fox, P. F., O'Connor, T. P., Mcsweeney, P. L. H., Guinee, T. P., ve O'Brien, N. M. (1996). Cheese: Physical, Biochemical, and Nutritional Aspects. *Advances in Food and Nutrition Research*, 39(C), 163–328. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(08\)60075-3](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(08)60075-3)
- Ghahremani, E., ve Mardani, M. (2015). Phenotypic and Genotypic Characterization of Lactic Acid Bacteria from Traditional Cheese in Khorramabad City of Iran with Probiotic Potential. 2516–2527. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1434-9>
- Gharbi, Y., Fhoula, I., Ruas-madiedo, P., Afef, N., Boudabous, A., .., M. (2019). In-vitro characterization of potentially probiotic *Lactobacillus* strains isolated from human microbiota : interaction with pathogenic bacteria and the enteric cell line HT29. 61–72.
- Gong, M., Jin, Q., ve Wang, X. (2019). Production of conjugated fatty acids : A review of recent advances. *Biotechnology Advances*, 37(8), 107454. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107454>

- Gomes, A., Buriti, A., Fonseca, A., Marta, S., ve Saad, I. (2009). Probiotic cheese : health benefits, technological and stability aspects. 20, 344–354. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.05.001>
- Gürsoy, O., ve Kımık, Ö. (2005). Laktobasiller ve Probiyotik Peynir Üretiminde Kullanım Potansiyelleri. *MühendislikBilimleriDergisi*,11(3), 361–371.
- Hayaloglu, A. A., Guven, M., ve Fox, P. F. (2002). Microbiological , biochemical and technological properties of Turkish White cheese ‘ Beyaz Peynir .’12, 635–648.
- Homayouni, A., Ansari, F., Azizi, A., Pourjafar, H., ve Madadi, M. (2018). Cheese as a Potential Food Carrier to Deliver Probiotic Microorganisms into the Human Gut : A Review Cheese as a Potential Food Carrier to Deliver Probiotic Microorganisms into the Human Gut :A Review. (August). <https://doi.org/10.2174/1573401314666180817101526>
- Jabbari, V., Khiabani, M. S., ve Mokarram, R. R. (2017). Lactobacillus plantarum as a Probiotic Potential from Kouzeh Cheese (Traditional Iranian Cheese) and Its Antimicrobial Activity. 189–193. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9255-0>
- Kalkan, S. (2020). Predicting the antimicrobial effect of probiotic lactic acid bacteria against Staphylococcus aureus in white cheeses, using Fourier series modeling method. *Journal of Food Safety*, 40(1). <https://doi.org/10.1111/jfs.12724>
- Kazancıgil, E., Demirci, T., Öztürk-Negiş, H. İ., ve Akın, N. (2019). Isolation, technological characterization and in vitro probiotic evaluation of Lactococcus strains from traditional Turkish skin bag Tulum cheeses. *Annals of Microbiology*, 69(12), 1275–1287. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01512-4>
- Kuleas, H., ve Gu, A. (2009). *LWT - Food Science and Technology* Manufacture of Turkish Beyaz cheese added with probiotic strains. 42, 1003–1008. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.12.015>
- Kos B, Uskovic JS, Vukovic S, Impraga MS, Frece J, Matosic S.(2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain Lactobacillus acidophilus M92. *J. Appl. Microbiol.*; 94, 981–987. PMID: 12752805
- Kosikowski, F. V., and V. V. Mistry. (1997). Cheese and Fermented Milk Foods. Vol. II. F. V. Kosikowski L.L.C., Great Falls, VA

- Li, P., Gu, Q., Yang, L., Yu, Y., ve Wang, Y. (2017). Characterization of extracellular vitamin B 12 producing *Lactobacillus plantarum* strains and assessment of the probiotic potentials. *Food Chemistry*, 234, 494–501. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.037>
- Margalho, L. P., Jorge, G. P., Noleto, D. A. P., Silva, C. E., Abreu, J. S., Piran, M. V. F., ... Sant, A. S. (2021). Biopreservation and probiotic potential of a large set of lactic acid bacteria isolated from Brazilian artisanal cheeses: From screening to in product approach. *Microbiological Research*, 242(October 2020), 126622. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126622>
- Maria, B., Souza, S. De, Borgonovi, T. F., Casarotti, S. N., Todorov, S. D., Lúcia, A., ve Penna, B. (2019). Mariarameters and Viability under Gastrointestinal Tract Conditions. 382–396.
- Mohammed, S., ve Çon, A. H. (2021). Isolation and characterization of potential probiotic lactic acid bacteria from traditional cheese. *LWT*, 152(April), 112319. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112319>
- Montalto, M., Onofrio, F. D., Gallo, A., Cazzato, A., ve Gasbarrini, G. (2009). Intestinal microbiota and its functions. *Digestive and Liver Disease Supplements*, 3(2), 30–34. [https://doi.org/10.1016/S1594-5804\(09\)60016-4](https://doi.org/10.1016/S1594-5804(09)60016-4)
- Morandi, S., Silvetti, T., Vezzini, V., Morozzo, E., ve Brasca, M. (2020). How we can improve the antimicrobial performances of lactic acid bacteria? A new strategy to control *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola cheese. *Journal Of Food Microbiology*, 90(March), 103488. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103488>
- Mortazavian, A., ve Cruz, A. (2011). Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review *HAL Id: hal-00930609*. (May). <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0005-x>
- Motalebi Moghanjoughi, Z., Rezazadeh Bari, M., Alizadeh Khaledabad, M., Almasi, H., ve Amiri, S. (2020). Bio-preservation of white brined cheese (Feta) by using probiotic bacteria immobilized in bacterial cellulose: Optimization by response surface method and characterization. *LWT*, 117(April 2019), 108603. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108603>

- Muñoz-quezada, M. B. J. P. S., ve Gil, C. G. A. (2012). Probiotic Mechanisms of Action. 160–174. <https://doi.org/10.1159/000342079>
- Mushtaq, M., Gani, A., Noor, N., ve Masoodi, F. A. (2021). Phenotypic and probiotic characterization of isolated LAB from Himalayan cheese (Kradi / Kalari) and effect of simulated gastrointestinal digestion on its bioactivity. *LWT*, 149(May), 111669. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111669>
- Mishra V, Prasad D (2005) . Application of in vitro methods for selection of Lactobacillus casei strains as potential probiotics. *Int J FoodMicrobiol* 103:109-115
- Neish, A. S. (2002). The gut microflora and intestinal epithelial cells: a continuing dialogue. 4, 309–317.
- Of, D., Microbiological, C., On, P., Samples, C., From, C., ve In, S. (2021). *Gida the journal of food*. 46, 489–499. <https://doi.org/10.15237/gida.GD20121>
- Oldak, A., Zielińska, D., Lepecka, A., Długosz, E., ve Kołożyn-Krajewska, D. (2019). Lactobacillus plantarum Strains Isolated from Polish Regional Cheeses Exhibit Anti-Staphylococcal Activity and Selected Probiotic Properties. Probiotics and Antimicrobial Proteins. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09587-w>
- Öner, Z. ve Sarıdağ, A. M. (2019). Keçi Sütünden Üretilmiş Beyaz Peynirlerde Olgunlaşma Süresince Meydana Gelen Değişimler. *Gıda*, 44 (3), 523-533 . DOI: 10.15237/gida.GD19048
- OTOole, P. W., Marchesi, J. R., ve Hill, C. (2017). Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.57>
- Ozkan, E. R., ve Demirci, T. (2021b). In vitro assessment of probiotic and virulence potential of Enterococcus faecium strains derived from artisanal goatskin casing Tulum cheeses produced in central Taurus Mountains of Turkey. 141(January). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110908>
- Park, Y.H., Jong, G.K., Young, W.S., Sae, H.K., Kwang, Y.W., (2007). Effect of dietary inclusion of Lactobacillus acidophilus ATCC 43121 on cholesterol metabolism in rats. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 655–662.
- Plessas, S., Nouska, C., Karapetsas, A., Kazakos, S., Alexopoulos, A., Mantzourani, I., ... Bezirtzoglou, E. (2017). Isolation , characterization and evaluation of the probiotic

- potential of a novel *Lactobacillus* strain isolated from Feta-type cheese. *Food Chemistry*, 226, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.052>
- Prabhurajeshwar, C., ve Chandrakanth, K. (2019). Evaluation of antimicrobial properties and their substances against pathogenic bacteria in-vitro by probiotic *Lactobacilli* strains isolated from commercial yoghurt. *Clinical Nutrition Experimental*, 23, 97–115. <https://doi.org/10.1016/j.yclnex.2018.10.001>
- Prasad, J., Gill, H., Smart, J., ve Gopal, P. K. (2000). Selection and Characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Strains for Use as Probiotics. 6946(99).
- Razack, S. A., Velayutham, V., ve Thangavelu, V. (2013). Medium optimization for the production of exopolysaccharide by *Bacillus subtilis* using synthetic sources and agro wastes. 280–288. <https://doi.org/10.3906/biy-1206-50>
- Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., ve Penna, A. L. B. (2012). Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds : Characteristics and Applications. 124–140. <https://doi.org/10.1007/s12393-012-9051-2>
- Renes, E., Linares, D. M., González, L., Fresno, J. M., Tornadijo, M. E., ve Stanton, C. (2017). Study of the conjugated linoleic acid synthesis by *Lactobacillus* strains and by different co-cultures designed for this ability. *Journal of Functional Foods*, 35, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.05.015>
- Rhoades, J., Anastasiou, I., Koinidis, A., Doulgerakis, C., Alexa, E. A., Alvarez-ord, A., ve Likotra, E. (2021). Microbiological analysis of Greek Protected Designation of Origin cheeses and characterisation of the isolated lactic acid bacteria. 123. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105183>
- Rinkinen, M., Westermarck, E., Salminen, S., ve Ouwehand, A. C. (2003). Absence of host specificity for in vitro adhesion of probiotic lactic acid bacteria to intestinal mucus. 97, 55–61. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(03\)00183-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00183-4)
- Rivera-espinoza, G. M. Y. (2013). In Vitro Evaluation of the Probiotic Potential of Halotolerant *Lactobacilli* Isolated from a Ripened Tropical Mexican Cheese. 239–251. <https://doi.org/10.1007/s12602-013-9144-0>
- Rolim, F. R. L., Neto, O. C. F., Oliveira, M. E. G., Oliveira, C. J. B., ve Queiroga, R. C. R. E. (2020). Trends in Food Science & Technology Cheeses as food matrixes for

- probiotics: In vitro and in vivo tests. *Trends in Food Science & Technology*, 100(April), 138–154. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.008>
- Romário, D., Cássia, J. De, Sardi, O., Souza, N. De, Magri, S., Cristina, A., & Luiz, P. (2020). Probiotics as an alternative antimicrobial therapy: Current reality and future directions. *Journal of Functional Foods*, 73(July), 104080. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104080>
- Roy, D., Mainville, I., Mondou, F., (1997). Selective enumeration and survival of bifidobacteria in fresh cheese. *International Dairy Journal* 7, 785–793
- Ruiz-Moyano, S., Gonçalves dos Santos, M. T. P., Galván, A. I., Merchán, A. V., González, E., Córdoba, M. de G., ve Benito, M. J. (2019). Screening of autochthonous lactic acid bacteria strains from artisanal soft cheese: probiotic characteristics and prebiotic metabolism. *LWT*, 114. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108388>
- Sameer, B., Ganguly, S., Khetra, Y., ve Sabikhi, L. (2020). Development and Characterization of Probiotic Buffalo Milk Ricotta Cheese. *Lwt*, 121(July 2019), 108944. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108944>
- Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M., ve Finlay, B. B. (2021). Gut Microbiota in Health and Disease. 859–904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>.
- Shahid, M., Rajoka, R., Siddiq, M., Haobin, Z., Zhu, J., Yan, L., ... Shi, J. (2017). *LWT - Food Science and Technology* Identification, characterization, and probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from human milk. 84. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.055>
- Sharma, S., ve Singh, S. (2017). Adherence potential of indigenous lactic acid bacterial isolates obtained from fermented foods of Western Himalayas to intestinal epithelial Caco-2 and HT-29 cell lines. *Journal of Food Science and Technology*, 54(11), 3504–3511. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2807-1>
- Sharma, S., ve Kanwar, S. S. (2018). Effect of prebiotics on growth behaviour of *Lactobacillus plantarum* and their impact on adherence of strict anaerobic pathogens to intestinal cell lines. *Journal of Food Safety*, 38(1), e12384.
- Shehata, M. G., Sohaimy, S. A. El, El-sahn, M. A., ve Youssef, M. M. (2016). Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and

- bile salt hydrolase activity. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(1), 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2016.03.001>
- Shi, Y., Cui, X., Gu, S., Yan, X., Li, R., Xia, S., Ge, J. (2019). Antioxidative and Probiotic Activities of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Artisanal Milk Cheese from Northeast China. 1086–1099.
- Talbot-Walsh, G., Kannar, D., ve Selomulya, C. (2018). A review on technological parameters and recent advances in the fortification of processed cheese. *Trends in Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.023>
- Terpou, A., Bosnea, L., Kanellaki, M., Plessas, S., Bekatorou, A., Bezirtzoglou, E., ve Koutinas, A. A. (2018). Growth Capacity of a Novel Potential Probiotic *Lactobacillus paracasei* K5 Strain Incorporated in Industrial White Brined Cheese as an Adjunct Culture. 83(3). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14079>
- Tok, E., & Aslim, B. (2010). Cholesterol removal by some lactic acid bacteria that can be used as probiotic. *Microbiology and immunology*, 54(5), 257-264.
- Toole, P. W. O., Marchesi, J. R., ve Hill, C. (2020). Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nature Publishing Group*, (April 2017). <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.57>
- Torlak, E. (2016). Effect of Tween 80 on Conjugated Linoleic Acid Production by *Lactobacillus* Strains in Reconstituted Skim Milk Powder [1] *Lactobacillus* Suşlarının Rekonstitüe Yağsız Süt Tozunda Konjuge Linoleik Asit Üretimine Tween 80 ' in Etkisi. 22(3), 51–55. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2015.14445>
- Ullah, N., Wang, X., Wu, J., Guo, Y., Ge, H., Li, T., ... Feng, X. (2017). *LWT - Food Science and Technology* Purification and primary characterization of a novel bacteriocin , LiN333 , from *Lactobacillus casei* , an isolate from a Chinese fermented food. *LWT - Food Science and Technology*, 84, 867–875. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.056>
- Uymaz, B. (2010). Probiyotikler ve Kullanım Alanları Probiotics and Their Use. *PAÜ Mühendislik Bilimleri Dergisi* 95–104.
- Vázquez-rodríguez, J. A., Lomelí, M. L., González-martínez, B. E., ve Vázquez-rodríguez, J. A. (2018). Cholesterol assimilation , acid and bile survival of probiotic bacteria

isolated from food and reference strains. *CyTA - Journal of Food*, 16(1), 36–41.
<https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1335347>

- Vinderola, C. G., ve Reinheimer, J. A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria : a comparative “ in vitro ” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. 36, 895–904. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00098-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00098-X)
- Woraprayote, W., Malila, Y., Sorapukdee, S., ve Swetwathana, A. (2016). Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *MESC*, 120, 118–132. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.004>
- Xie, Y., Zhang, H., Liu, H., Xiong, L., Gao, X., Jia, H., Han, T. (2015). Hypocholesterolemic effects of *Kluyveromyces marxianus* M3 isolated from Tibetan mushrooms on diet-induced hypercholesterolemia in rat. 395(7), 389–395.
- Yavuzdurmaz, H.,(2007). *Isolation, Characterization, Determination Of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria from Human Milk*. MS Thesis, IZTECH, İzmir, Türkiye
- Yilmaztekin, M., Özer, B. H., ve Atasoy, F. (2004). Survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-02 in white-brined cheese. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 55(1), 53–60.
<https://doi.org/10.1080/09637480310001642484>
- Yüksel, Z. , Akçelik, N. Uymaz, B. (2020). Physicochemical and Microbiological Characterization of Protected Designation of Origin Ezine Cheese: Assessment of Non-starter Lactic Acid Bacterial Diversity with Antimicrobial Activity . *Food Sci Anim Resour.* 2019 Oct; 39(5): 804–819.. doi: 10.5851/kosfa.2019.e71

EKLER

Ek 1. Çalışmada kullanılan kimyasallar, besiyerleriveürün kodları

	Kimyasal Adı	Kimyasal Kodu
1.	Agar	Biolife 03X036
2.	Asetik asit	Merck-A6282
3.	İso amil alkol	Merck -W205702
4.	Baird Parker Agar	Merck -1054060500
5.	Bromokresol mor	Merck-1.028
6.	Civa(II) iyodür	Sigma-10015
7.	Disodyum fosfat	Applichem -A2943
8.	DMEM/Yüksek glikoz	Cytivd-SH3002201
9.	D-Mannitol	Sigma-63560
10.	D-(+)-Mannoz	Sigma-63580
11.	EMB Agar	Merck-101134470500
12.	Etil asetat	İTK-10081000
13.	Fenolfitaleyn	Sigma33518
14.	Fosfat tamponlu tuztablet	Sigma-P4417-100TAB
15.	Gliserol	Sigma-G5516
16.	Gümüş nitrat	Sigma33519
17.	Hidrojen peroksit	Merck-A6383
18.	Hidroklorik asit	Sigma33520
19.	İzopropil alkol	Merck-1096342511
20.	Kloroform	İTK-10071000
21.	Kolestrol	Applichem A0985
22.	Konjuge linoleik asit	Sigma-16413
23.	Ksilen	Sigma-16446
24.	Lab-Lemod tozu	Oxoid LP 0029
25.	L-Arginin monohidroklorür	Merck 101543
26.	Linoleik asit	Sigma-BCBZ1886
27.	MagnezyumSülfat	Applichem-A1037
28.	Maya ekstraktı	Applichem -A3732
29.	Metilen mavi	Fluka-66720-100
30.	Mono Potasyum Fosfat	Riodel de haen-04243
31.	Müeller Hinton Agar	Merck 1.05437
32.	n-Hekzan	Merck -1043682511
33.	Nutrient Broth	Merck 1.05443
34.	O-fitaldehit reaktifi	Sigma -33518-100
35.	Plate Count Agar	Merck-1054630500
36.	Pankreatin	Applichem A0807
37.	Patates Dekstroz Agar	Merck -11011300500
38.	Pepsin	Merck 1.07185
39.	Pepton	Oxoid-LP0037
40.	Potasyum hidroksit	Sigma-SZBC1000V
41.	Potasyum iyodür	Merck-1050431000

Ek 1. Çalışmada kullanılan kimyasallar, besiyerleri ve ürün kodları (devamı)

42.	Potasyum klorür	Sigma-12636
43.	Potasyum kromat	Sigma-135636
44.	Riboz	Merck-107605
45.	Selobiyoz	Fluka-22150
46.	Sodyum asetat	App - A4555
47.	Sodyum hidroksit	Merck-1064981000
48.	Sodyum klorür	Merck-1064041000
49.	Sodyum sitrat trisodyum	Sigma-4641
50.	Sodyum taurodeoksikolat hidrat	Sigma-T0875
51.	Sülfürik asit	Sigma -07208
52.	Sükroz	Merck-1.07651
53.	Teksol %96 Ekstra saf	TK-20065005001
54.	Tween 80 ilaveli MRS broth	Biolife -4017292

Ek 2. Boyamada kullanılan çözeltilerin içeriği ve hazırlanışı

A) Gram İyot Çözeltisi (Lugol)

	g/ml
İyod	1
Potasyum iyodür	2
Distile su	300

İyot ve potasyum iyodür bir cam beher içinde 20ml distile suyla çözündürülmüştür, kalan suyun tamamı üzerine ilave edilmiştir. Süzülür, koyu renkli şişeye konarak ve saklanmıştır.

B) Kristal Viyole Çözeltisi

	g/ml
Kristal viyole	2
%95'lik Etil alkol (etanol)	20ml (cc)
Amonyum oksalat	0,8
Distile su	80

Kristal viyole etil alkol içinde karıştırılarak çözündürülmüştür. Amonyum oksalat saf su ile hazırlanan solüsyonun üzerine ilave edilmiştir.

C) Safranin Çözeltisi

	g/ml
Safranin	0,5
%95'lik Etil alkol (etanol)	10
Distile su	100

Safranin 0,5 g boya tartılarak, 10 ml etanol (%95'lik) içerisinde çözündürülmüştür. 100 ml distile su ilave edilerek iyice karıştırılmış ve süzümüştür.

Ek 3. Fizyolojik ve biyokimyasal analizler için modifiye MRS besiyeri içeriği

Farklı Sıcaklıklarda Büyüme Deneyi için Modifiye MRS Besiyeri;

MRS BROTH	g/l
Pepton	10,0
Lab-Lemco et ekstraktı	10,0
Maya ekstraktı	5,0
D (-) Glucose	20,0
Tween 80	1 ml
K ₂ HPO ₄	2,0
Sodyum asetat	5,0
Triammonyum sitrat	2,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,05
Bromkresol moru	0,04
Distile su	1000 ml

Tüm bileşenler distile su içerisinde çözülmüş ve pH 6,2-6,6'ya ayarlanmıştır. Besi yeri, 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Büyüme Deneyi için Modifiye MRS Besiyeri

MRS BROTH	g/l
Pepton	10,0
Lab-Lemco et ekstraktı	10,0
Maya ekstraktı	5,0
D (-) Glucose	20,0
Tween 80	1 ml
K ₂ HPO ₄	2,0
Sodyum asetat	5,0
Triammonyum sitrat	2,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,05
Bromkresol moru	0,04
NaCl	%4, %6,5 ve %10
Distile su	1000 ml

Tüm bileşenler distile su içerisinde çözülmüş ve pH 6,2-6,6'ya ayarlanmıştır. Durham tüpleri ters olarak test tüplerine yerleştirilmiştir. Besi yeri, 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir

Karbonhidrat Fermentasyon Testi için Modifiye MRS Broth

MRS BROTH	g/l
Pepton	10,0
Lab-Lemco et ekstraktı	10,0
Maya ekstraktı	5,0
D (-) Glucose	20,0
Tween 80	1 ml
K ₂ HPO ₄	2,0
Sodyum asetat	5,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,05
Distile su	1000 ml

Tüm bileşenler distile su içerisinde çözülmüş ve pH 6,2-6,6'ya ayarlanmıştır. Durham tüpleri ters olarak test tüplerine yerleştirilmiştir. Besi yeri, 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

Ekzapolisakkarit deneyi için Modifiye MRS Broth

MRS BROTH	g/l
Pepton	10,0
Lab-Lemco et ekstraktı	10,0
Maya ekstraktı	5,0
Sükroz	100,0
Tween 80	1 ml
K ₂ HPO ₄	2,0
Sodyum asetat	5,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,05
Distile su	1000 ml

Tüm bileşenler distile su içerisinde çözülmüş ve pH 6,2-6,6'ya ayarlanmıştır. Besi yeri, 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

Ek 4. Analizlerde kullanılan reaktif ve tamponlu solüsyon içeriği ve hazırlanışı

Nessler Reaktifi Hazırlanışı;

	g/ml
Cıva (II)iyodür(HgI ₂)	10
Potasyum iyodür (KI)	7
Sodyum hidroksit (NaOH)	16
Distile su	100

Cıva (II) iyodür ve potasyum iyodür yaklaşık 20 ml çözülerek karıştırılmıştır. Sodyum hidroksit 50 ml çözünmüş ve karışıma ilave edilmiştir. Toplam hacim 100 ml tamamlanmıştır. Nessler reaktifi (+4 °C) 12 ay muhafaza edilebilmektedir.

Fosfat Tamponlu Tuzlu Su (PBS)Hazırlanışı ;

	g/L
NaCl	8
KCl	0.2
Na ₂ HPO ₄	1.64
KH ₂ PO ₄	24
Distile su	1000 ml

Tüm bileşenler distile su içerisinde çözündürülmüştür. Ph (7,0-7,4) ayarlanmış ve 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Ek 5. KLA standart solüsyonu hazırlanışı ve eğrisi

KLA Üretimi Deneyi için Standart Solüsyon Hazırlanması:

Ekstraksiyon ilk adımında ne kadar KLA kullanmamız gerektiğini belirlemek için öncelikle bir kalibrasyon eğrisi hazırladık. Bu bölümün başında KLA (9-cis, 11-trans, > %96 saflık) analitik standardı ve n-heksan kullanılmıştır. 20ml KLA standardı ve n-heksan 1:1 oranında ölçülerek bir tüpte karıştırıldı. Karışık çözelti, amber kahverengi bir laboratuvar cam reaktif şişesine (50 ml) aktarıldı.

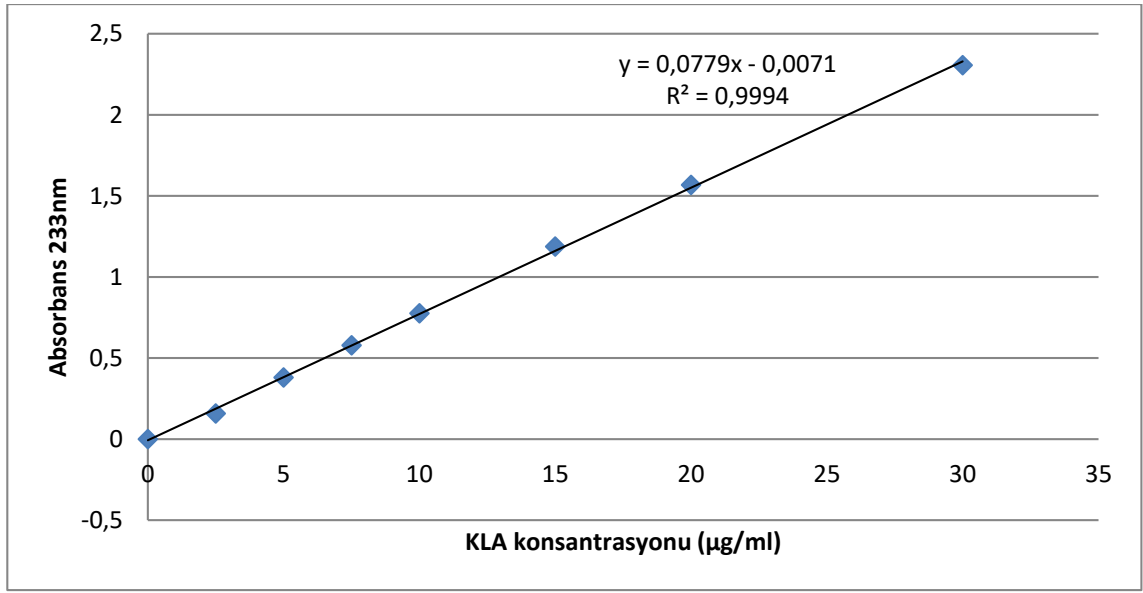
Ara stok solüsyonu hazırlamak için 8 farklı konsantrasyonda (0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20 ve 30µg/ml) 8 adet falcon tüp kullanılmıştır. Başlangıçta 20 µg/ml ve 30 µg/ml KLA solüsyonları falcon tüplerine 7.5 ml standart stok solüsyondan (1 mg/ml KLA , n-heksan karışımı) ve 7.5 ml n-heksan kullanılarak 15 ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Her boş tüpe 7.5 ml n-heksan ilave edildi ve bu konsantrasyonlar (0, 2.5, 5, 7.5, 10 ve 15µg/ml) 20 ve 30 µg/ml ara stok çözeltilerinin 1:1 oranında seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.

Hazırlanan stok ve ara stok çözeltileri +4°C'de saklanabilir.

UV-Spektrofotometri ile KLA Tayini:

Bu bölümde spektrofotometrik yöntem kullanılarak çalışmamızda uygun KLA kullanım miktarını belirlenmiştir 233 nm dalga boyunda maksimum absorbans değerleri için kuvars küvetler kullanılmıştır.

İlk kalibrasyon (auto zero) n-heksan kullanılmış, diğer konsantrasyonlar UV-1800 Spektrofotometer ile 2 paralel olacak şekilde ölçülmüştür. Elde edilen veriler ve hesaplanan kalibrasyon eğrisi tablo aşağıdaki gibidir.



Kalibrasyon eğrisi KLA standart solüsyonu

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

“GELENEKSEL PEYNİRLERDEN İZOLE EDİLMİŞ LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BAZI PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE BEYAZ PEYNİR ÜRETİMİNDE KULLANIMI” başlıklı Yüksek Lisans tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Sevda TUNAR BAKAN

12 / 11 / 2021