

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YÖRESEL PEYNİRLERDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNE AİT SUŞLARIN BAZI TEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ

Fatma Aylin SEZER

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2024

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

YÖRESEL PEYNİRLERDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNE AİT SUŞLARIN BAZI TEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Fatma Aylin SEZER

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

Laktik asit bakterileri (LAB), sütün hızlı asitlendirilmesi gibi temel starter özellikleri yanında, peynirin olgunlaşması sırasında da ikincil mikrobiyota olarak işlev görmektedirler. Çiğ sütte bu tür dinamik LAB toplulukları tarafından üretilen enzimler, peynirin lezzet ve dokusunun temel oluşturucuları olarak proteolizi ve lipolizi destekledikleri için çok önemlidirler. Bunun yanı sıra, son zamanlarda, pek çok LAB türü, insan sağlığını başarılı bir şekilde destekleyen probiyotikler olarak karakterize edilmiş ve kullanıma sunulmuştur. Bu tez çalışmasında, Gaziantep, Şanlıurfa ve Mardin illerinden toplanan, geleneksel olarak üretilmiş ev yapımı peynirlerden izole edilen laktik asit bakterilerine ait suşların, bazı teknolojik özellikleri araştırılmıştır. Bu doğrultuda yürüttüğümüz çalışmalar sonucunda; değişik indikatör bakterilere karşı yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip izolatlar belirlenmiş ve asit üretme yetenekleri, proteolitik ve dekarboksilaz aktiviteleri, in vitro koşullarda gastrointestinal sistemde düşük pH, pepsin, pankreatin, safra tuzuna karşı dirençlilikleri, otoagregasyon ve koagregasyon yetenekleri, Caco-2 hücrelerine tutunma düzeyleri tanımlanarak, bu izolatların güçlü starter kültür ve probiyotik adayları olduğu belirlenmiştir. Bu izolatların 16S rDNA dizi analizleri ile tanımlanmaları sonucunda ise, tüm izolatların *Pediococcus acidilactici* suşları olduğu saptanmıştır. Gelişmiş ülkelerde endüstriyel starter kültür kullanımı çok uzun bir geçmişe sahip olduğu için yeni starter kültür ya da probiyotik adaylarının tanımlanması neredeyse olanaksız hale gelmiştir. Bunun aksine halen yaygın bir şekilde geleneksel peynir üretiminin yapıldığı ülkemizde starter kültür özelliğine sahip potansiyel aday suşların bulunma olasılığı oldukça yüksektir. Bu sebepten dolayı çalışmamız hem özgün değer hem de bilimsel/katma değer bakımından önem arz etmektedir.

Eylül 2024, 90 sayfa

Anahtar Kelimeler: *P. acidilactici*, starter kültür, laktik asit bakterileri, probiyotik, peynir

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF SOME TECHNOLOGICAL PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM TRADITIONAL CHEESE

Fatma Aylin SEZER

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

Supervisor: Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

Lactic acid bacteria (LAB) function as secondary microbiota during cheese ripening, in addition to their primary starter properties such as rapid acidification of milk. The enzymes produced by such dynamic LAB communities in raw milk are very important as they support proteolysis and lipolysis as key constituents of cheese flavor and texture. In addition, recently, many LAB species have been characterized and introduced as probiotics that successfully support human health. In this thesis, some technological properties of lactic acid bacteria strains isolated from traditionally produced homemade cheeses collected from Gaziantep, Şanlıurfa and Mardin provinces were investigated. As a result of the studies carried out in this direction; isolates with high antibacterial activity against different indicator bacteria were identified and their acid producing abilities, proteolytic and decarboxylase activities, resistance to low pH, pepsin, pancreatin, bile salt, autoaggregation and coaggregation abilities, adhesion to Caco-2 cells in the gastrointestinal tract under in vitro conditions were identified and these isolates were determined to be strong starter culture and probiotic candidates. Identification of these isolates by 16S rDNA sequence analysis revealed that all isolates were *Pediacoccus acidilactici* strains. Since the use of industrial starter cultures has a long history in developed countries, it has become almost impossible to identify new starter cultures or probiotic candidates. On the contrary, in our country where traditional cheese production is still widespread, the possibility of finding potential candidate strains with starter culture properties is quite high. For this reason, our study is important both in terms of original value and scientific/additive value.

September 2024, 90 pages

Key Words: *P. acidilactici*, starter culture, lactic acid bacteria, probiotic, cheese

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her türlü çalışma olanağını sağlayan, çalışmalarında ilgi ve desteğini eksik etmeyen, engin bilgi, tecrübe ve önerileriyle çalışmalarında bana yol gösteren değerli danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU'na (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü) en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım süresince bana her anlamda yardımcı olan, laboratuvar imkanlarından yararlanmama izin veren, değerli fikirleri, tecrübesi ve bilgileriyle tez çalışmama önemli katkılarda bulunan Sayın Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü) en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında bana destek olan çalışma arkadaşlarım Asiye Nur KARACA ve Tuba Nur SÜRKAÇ'a

Bugünlere gelmemi sağlayan, emeklerini esirgemeyen, fedakarlıklarını eksik etmeyen ve bana doğru yolu gösterip başarıya ulaşmamda her an destekçim olan sevgili annem Neslihan SEZER ve sevgili babam Mehmet Akif SEZER, sevgili kardeşlerim Yıldırım Beyazıd SEZER ve Ahmet Sancar SEZER'e

Her koşulda yanımda olan, manevi destekleri ile bana güç veren, bilgilerini eksik etmeyen ve dostluklarını sonuna kadar hissettiğim arkadaşlarım Hale Elçin LATİFİ, Gamze Nur ERDOĞAN ve Kağan ÖZDEMİR'e katkılarından dolayı sonsuz ve en içten teşekkürlerimi sunarım.

Benimle hep gurur duyan, her zaman en iyi yerlere gelmemi isteyen ve bunun için desteklerini esirgemeyen rahmetli canım dedem, Seyit Ahmet SEZER'e minnettarlığımı sunarım.

Fatma Aylin SEZER

Ankara, Eylül 2024

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI

ETİK.....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ÖZET.....i

ABSTRACTii

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....iii

SİMGELER DİZİNİvi

ŞEKİLLER DİZİNİviii

ÇİZELGELER DİZİNİx

1. GİRİŞ1

2. KURAMSAL TEMELLER.....4

2.1 Peynir4

2.1.1 Peynir üretimi.....5

2.2 Laktik Asit Bakterileri.....8

2.2.1. Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması8

2.2.2 Laktik asit bakterilerinin starter kültür olarak kullanımları.....11

2.2.3 Laktik asit bakterilerinin probiyotik olarak kullanımları13

2.2.3.1 *Pediococcus* türleri18

3.MATERYAL VE YÖNTEM22

3.1 Materyal22

3.1.1 Peynir örnekleri.....22

3.1.2 Bakteriler22

3.1.3 Besiyerleri ve çözeltiler23

3.2 Yöntem27

3.2.1 Peynir örneklerinin toplanması27

3.2.2 Bakterilerin izolasyonu27

3.2.3 Bakterilerin antimikrobiyal aktivite spektrumlarının belirlenmesi.....28

3.2.4 Gram boyama29

3.2.5 Asidifikasyon aktivitesi.....29

3.2.6 Proteolitik aktivite.....30

3.2.7 Dekarboksilaz aktivitesi30

3.2.8 İzolatların farklı çevresel koşullara karşı dirençliliklerinin belirlenmesi ..30

3.2.9 Otoagregasyon33

3.2.10 Koagregasyon34

3.2.11 İzolatların Caco-2 hücrelerine tutunması.....	35
3.2.12 16S rDNA dizi analizi ile izolatların tanımlanması.....	36
3.2.12.1 Genomik DNA izolasyonu ve saflaştırılması	36
3.2.12.2 16S rDNA bölgesinin PZR ile çoğaltılması	37
3.2.12.3 Agaroz jel elektroforezi	38
3.2.12.4 Sanger DNA dizi analizi	38
3.2.13 İstatistiki analizler.....	39
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	40
4.1 Peynir Örneklerinin Yapısal Özellikleri	40
4.2 İzolatların Antimikrobiyal Aktivite Özellikleri	41
4.3 Gram Boyama	42
4.4 Asidifikasyon Aktivitesi.....	43
4.5 Proteolitik Aktivite.....	45
4.6 Dekarboksilaz Aktivitesi.....	45
4.7 İzolatların in vitro Koşullarda Gösterdiği Probiyotik Potansiyel	46
4.8 Otoagregasyon	60
4.9 Koagregasyon	61
4.10 İzolatların Caco-2 Hücrelerine Tutunması.....	64
4.11 16S rDNA Dizi Analizi ile İzolatların Tanımlanması	64
4.11.1 16S rDNA bölgesinin PZR ile çoğaltılması	64
4.11.2 İzolatların tanısı	65
4.12 İstatistiki Analiz Sonuçları.....	65
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	68
KAYNAKLAR	74
EKLER.....	83
EK 1 DİZİ ANALİZ SONUÇLARI.....	83
EK 2 %CANLILIK DÜZEYLERİ.....	86
ÖZGEÇMİŞ.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Selsius Derecesi
C ₁₅ H ₁₆ O ₉	Eskulin
C ₁₈ H ₃₈ N ₄ O ₁₅ S	Kanamisin Sülfat
C ₆ H ₁₁ FeNO ₇	Amonyum Demir(III) Sitrat
Caco-2	İnsan Kolon Epidermal Adenokarsinom Hücre Hattı
CaCO ₃	Kalsiyum Karbonat
CD36	Membran glikoproteini
CO ₂	Karbondioksit
FAO	Tarım ve Gıda Örgütü
FeSO ₄ .7H ₂ O	Demir Sülfat Heptahidrat
FZU106	<i>P. acidilactici</i> 'nin bir suşu
g	Gram
GIS	Gastrointestinal Sistem
GR-1	<i>P. acidilactici</i> 'nin bir suşu
GRAS	Generally Regarded As Safe (Genel olarak güvenli kabul edilen)
kb	Kilobaz
KEA	Kanamisin Eskülin Azid
KH ₂ PO ₄	Potasyum Dihidrojen Fosfat
kob/mL	Mililitredeki Koloni Oluşturan Birim
L	Litre
log	Logaritma
mg	Miligram
MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum Sülfat Heptahidrat
mM	Milimolar
MnSO ₄ .4H ₂ O	Manganez Sülfat Tetrahidrat
Na ₂ HPO ₄	Disodyum Hidrojen Fosfat
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	Sodyum Sitrat
NaCl	Sodyum Klorür
NaN ₃	Sodyum Azid
nm	Nanometre
OD	Optik Yoğunluk (dansite)
pA1c	<i>P. acidilactici</i> 'nin bir suşu
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
pH	Power of Hydrogen
PMC48	<i>P. acidilactici</i> 'nin bir suşu
rDNA	Ribozomal DNA
RNA	Ribonükleik Asit
rpm	Dakikada Devir Sayısı
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
sn	Saniye
Tris-HCl	Tris (Hidroksimetil)Aminometan Hidroklorür
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
µL	Mikrolitre

Kısaltmalar

ATCC	American Type Culture Collection
B.	<i>Bifidobacterium</i>
BSEP	Bile Salt Export Pump
CYP7A1	Cholesterol 7 alpha-hydroxylase geni
DMEM	Dulbecco Modifiye Eagle Medium
DNA	Deoksiribonükleik Asit
E.	<i>Enterococcus</i>
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EMP	Embden-Meyerhoff-Parna
FBS	Fetal Bovine Serum
G6P	Glucose-6 Phosphate
GCK	Glucokinase geni
GLP-1	Glucagon-like Peptide-1
HFD	High-fat diet
HM	Heavy Metal
HMGCR	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase
L.	<i>Lactococcus</i>
Lb.	<i>Lactobacillus</i>
LDLr	Low Density Lipoprotein receptor
LAB	Laktik Asit Bakterileri
LB	Luria Broth
Leu.	<i>Leuconostoc</i>
MRS	de Man Rogosa Sharpe
NB	Nutrient Broth
NCBI	National Center for Biotechnology Information
P.	<i>Pediococcus</i>
PEPCK	Phosphoenolpyruvate Carboxykinase
PreD	Prediyabet
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
S.	<i>Saccharomyces</i>
SREBP-1c	Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1
T2D	Tip II Diyabet
TAE	Tris-Asetat-EDTA
TSB	Tryptic Soy Broth
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Temel olarak peynir üretim aşamaları.....	7
Şekil 2.2 Laktik asit izomerleri.....	9
Şekil 2.3 Homofermantatif ve heterofermantatif metabolizma yolları.....	11
Şekil 2.4 Probiyotik seçim kriterleri.....	16
Şekil 2.5 Probiyotiklerin sağlık faydaları.....	18
Şekil 4.1 Çalışmada kullanılan peynir türleri.....	40
Şekil 4.2 Gram boyama görüntüleri.....	42
Şekil 4.3 İzolatların asidifikasyon aktivitesi.....	44
Şekil 4.4 Proteolitik aktivite ölçümleri.....	45
Şekil 4.5 İzolatların dekarboksilaz aktivitesi zon sonuçları.....	46
Şekil 4.6 AS26'nın düşük pH'a direnci.....	47
Şekil 4.7 AS32'nin düşük pH'a direnci.....	47
Şekil 4.8 AS40'ın düşük pH'a direnci.....	48
Şekil 4.9 AS53'ün düşük pH'a direnci.....	48
Şekil 4.10 AS57'nin düşük pH'a direnci.....	49
Şekil 4.11 AS66'nın düşük pH'a direnci.....	49
Şekil 4.12 AS26'nın pepsine direnci.....	50
Şekil 4.13 AS32'nin pepsine direnci.....	51
Şekil 4.14 AS40'ın pepsine direnci.....	51
Şekil 4.15 AS53'ün pepsine direnci.....	52
Şekil 4.16 AS57'nin pepsine direnci.....	52
Şekil 4.17 AS66'nın pepsine direnci.....	53
Şekil 4.18 AS26'nın pankreatine direnci.....	54
Şekil 4.19 AS32'nin pankreatine direnci.....	54
Şekil 4.20 AS40'ın pankreatine direnci.....	55
Şekil 4.21 AS53'ün pankreatine direnci.....	55
Şekil 4.22 AS57'nin pankreatine direnci.....	56
Şekil 4.23 AS66'nın pankreatine direnci.....	56
Şekil 4.24 AS26'nın safra tuzuna direnci.....	57
Şekil 4.25 AS32'nin safra tuzuna direnci.....	58

Şekil 4.26 AS40'ın safra tuzuna direnci.....	58
Şekil 4.27 AS53'ün safra tuzuna direnci.....	59
Şekil 4.28 AS57'nin safra tuzuna direnci.....	59
Şekil 4.29 AS66'nın safra tuzuna direnci.....	60
Şekil 4.30 İzolatların %otoagregasyon sonuçları.....	61
Şekil 4.31 İzolatların <i>Salmonella</i> ile %koagregasyon sonuçları.....	62
Şekil 4.32 İzolatların <i>Listeria</i> ile %koagregasyon sonuçları.....	63
Şekil 4.33 AS32 ve AS40'ın Caco-2 hücrelerine tutunma düzeyleri.....	64
Şekil 4.34 İzolatların çoğaltılmış 16S rDNA bölgelerinin PZR bant görüntüleri.....	65



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Türkiye’deki bazı peynir çeşitlerinin sınıflandırılması.....	5
Çizelge 2.2 Probiyotik olarak tanımlanan belli başlı mikroorganizmalar.....	15
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan besiyerleri ve agar.....	23
Çizelge 3.2 16S PZR adımları.....	38
Çizelge 4.1 Peynirlerin toplandıkları yerler ve yapısal özellikleri.....	40
Çizelge 4.2 İzolatların patojenlere karşı etkinlik gösterdiği kuyu difüzyon zon sonuçları.....	41
Çizelge 4.3 İzolatların asidifikasyon aktivitesi Δ pH değerleri.....	44
Çizelge 4.4 İzolatların %otoagregasyonları.....	60
Çizelge 4.5 İzolatların <i>Salmonella</i> ile %koagregasyonları.....	62
Çizelge 4.6 İzolatların <i>Listeria</i> ile %koagregasyonları.....	63

1. GİRİŞ

Peynir üretiminin, yaklaşık 8000 yıl önce Irak'ta Dicle ve Fırat nehirleri arasındaki “Bereketli Hilal/Fertile Crescent”de gerçekleştirildiği bilinmektedir. Söz konusu coğrafyanın bu şekilde adlandırılmasının temel sebebi, iki büyük nehir barındırması ve iklimsel özelliklerinden ileri gelmektedir (Fox vd. 1996). Bu bölge, coğrafi konumu ve ikliminden dolayı insanlık tarihine ilişkin araştırmalarda son derece önemli bir odak noktası olmuştur. Çok sayıda antropolog ve arkeolog tarafından yürütülen çalışmalar sonucunda, insanoğluna en önemli besin kaynaklarının buradan sağlandığı tespit edilmiştir. Tarım devriminin (Neolitik Çağ) en erken evrelerinden itibaren, insanların süt tükettiği bilinmektedir. Yine bu döneme ait yazıtlardaki figürlere bakıldığında, peynirin üretildiğini gösteren şekiller tespit edilmiştir. Peynirin yapımında kullanılan sütün fermentasyonu olayı ise koyun, inek gibi türlerin evcilleştirilmesinden sonra başlamıştır. Asya’da, Ortadoğu’da, Anadolu’da ve Makedonya’da evcilleştirilen bu türler sayesinde süt insanların diyetine girmiştir. Kesin bir bilgi olmamakla beraber, yaklaşık 8000 yıl öncesinde Mezopotamya veya İndus vadisinde çobanların ürettiği düşünülen peynir, tarım toplumlarında her zaman önemli ve gerekli bir gıda maddesi olmuştur. Bir düşünceye göre ise, sütün tesadüfen ekşimesiyle ve sonrasında da bilinçli bir şekilde ekşitilmesiyle peynirin ilk defa Avrasya’da üretildiği ön görülmektedir. Süt, kolay kontamine olması açısından özellikle sıcak iklimlerde raf ömrü kısa olan bir üründür. Bu nedenle Afrika ve Hindistan gibi çoğunlukla yağışlı ve sıcak bölgelerdeki insanların peynir ile tanışmaları diğer bölgelere göre daha geç olmuştur (Walther vd. 2008).

Fermente süt ürünleri içerisinde en yüksek çeşitliliğe sahip gıda peynirdir (Çakmakçı 2011). Dünyada yaklaşık 4000, Türkiye’de ise 150’den fazla peynir türü bulunmaktadır (Steele ve Ünlü 1992). Sütü kullanılacak hayvanın beslenme tipi, sütün cinsi (koyun, keçi, inek sütü peyniri), süte uygulanan işlem (pastörize, çiğ peynir), sütün yağ kapasitesi (tam, az, yağsız), tuz miktarı (tuzlu, tuzsuz), katkısız bileşenler (otlar, farklı baharat türleri, tuzlar, küfler), strüktürü (tam sert, sert, yumuşak ve akışkan), pıhtı oluşturma yöntemi (asit, maya peynirleri), olgunluk karakteri (olgunlaştırılmamış, orta düzeyde olgunlaştırılmış ya da tamamen olgunlaştırılmış) gibi faktörler, peynirlerin çeşitlenmesini sağlayan ana unsurlardır (Durlu-Özkaya ve Gün 2007).

Süt ve süt ürünleri gastrointestinal sistem (GIS) için önemli ve pozitif yönde etkili gıda maddeleridir. Peynir de bunlara bir örnektir. Bu ürünlerde doğal olarak yer alan laktik asit bakterileri (LAB), fermente süt ürünlerinin elde yapısal özelliklerinin oluşumunda, olgunlaşmasında, aroma ve tat bileşiklerinin üretiminde anahtar rol oynamaktadır. Gastrointestinal sistem için faydalı olan bu laktik asit bakterilerine ‘probiyotik’ adı verilmektedir. Yunancadan türetilen probiyotik teriminin anlamı ‘yaşam için’ demektir (Gupta ve Garg 2009). Lilly ve Stilwell 1965 yılında probiyotik terimini kullanan ve tanımlayan ilk araştırmacılar olmuşlardır. Probiyotik terimini, diğer mikroorganizmaların gelişimini destekleyen maddeler olarak tanımlamışlardır. Fermente süt ürünlerindeki laktik asit bakterileriyle ilk çalışmaları yapan bilim insanı Elie Metchnikoff’tur (Lilly ve Stilwell 1965).

Probiyotiklerin mide asidi, pankreatik enzimler, safra tuzu gibi etmenlere karşı direnç seviyeleri, GIS’de etkinliklerinin tanımlanmasında kullanılan ana kriterlerdir. Çünkü probiyotikler, GIS’in antimikrobiyel bariyerlerine karşı gösterdikleri direnç sayesinde konak sisteme yararlı olabilirler. Probiyotiklerin, GRAS (Generally Regarded As Safe) statüsündeki bakterilerden seçilmesi temel hareket noktasını oluşturmaktadır. Yani vücuda alındıklarında sağlığa herhangi bir zararı olmamalı ve toksin üretmemelilerdir. Bu sebeple bir bakterinin probiyotik olması ve gıda sistemlerinde kullanılabilmesi için bazı seçim kriterlerine uyması gerekir. Bu seçim kriterleri arasında; insan kaynaklı olmaları, patojenik karakter taşımamaları, mide bağırsak sisteminin bakteriyel yaşamı kısıtlayan koşullarına karşı direnç göstermeleri, mikroorganizmaların geniş spektrumuna karşı antagonistik bileşikler üretme yetenekleri, antibiyotiklere karşı duyarlı olmaları, immün sistem uyarım yetenekleri, bağırsak metabolizmasına katkıda bulunmaları (kolesterol asimilasyonu, laktaz aktivitesi, vitamin üretimi) ve gıda üretim süreçlerine uyumlu olmaları olarak özetlenebilir (Collins vd, 1998, Dunne vd, 2001, Önal-Darılmaz, 2010, Uymaz, 2010, Erem vd, 2013, Kechagia vd, 2013, Çomak-Göçer vd, 2016).

Ülkemizde üretilen çok sayıda peynir türünün doğal mikrobiyal florasının tespiti ve karakterizasyonu, bu geleneksel peynirlerin endüstriyel üretimi için son derece büyük bir önem arz etmektedir. Gelişmiş ülkelerde uzun zamandır üretim sürecinde faydalanılan

standart starter kùltürlerin kullanımı, ÷lkemizde aynı seviyede değildir. Endüstriyel üretimde belirli starter kùltürlerin kullanıldığı gelişmiş ÷lkelerin aksine hala yaygın bir şekilde geleneksel peynir üretiminin yapıldığı ÷lkemizde, starter kùltür özelliğine sahip potansiyel aday suşların bulunma olasılığı oldukça yüksektir. Bu sebepten dolayı çalışmamız hem özgün değer bakımından hem de bilimsel/katma değer bakımından önem arz etmektedir.

Bu çalışmada, starter kùltür kullanılmadan geleneksel tekniklerle üretilen ev yapımı yöresel peynirlerden LAB'leri izole edilmiştir. LAB'ne ait bu suşların, teknolojik olarak önem arz eden bazı özellikleri (asit üretme yetenekleri, proteolitik ve dekarboksilaz aktiviteleri, bakteriyosin üretimi ve değişik indikatör bakterilere karşı bakteriyosinin aktivite spektrumu, in vitro koşullarda suşların gastrointestinal sistemde düşük pH, pepsin, pankreatin, safra tuzuna karşı dirençliliği) ve biyokimyasal testler/16S rRNA gen sekanslama yöntemi ile tanımlamaları yapılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Peynir

Tarım toplumlarında süt tüketiminin başlamasıyla, özellikle sıcak iklimlerde raf ömrü kısa olan sütün, doğal yollarla fermentasyona uğrayıp, katı, yenilebilir bir gıdaya yani peynire dönüştüğü düşüncesi, peynirin ilk nasıl elde edildiği sorusuna bir öngörü oluşturmaktadır. Günümüze kadar gelen bu süreçte sütün bilinçli bir şekilde fermente edilip peynire dönüştürülmesinin temel nedeni; hızla bozulan bir gıdayı korumaya almak, dayanıklı ve depolanabilir bir ürün haline getirmektir (Walther vd. 2008).

Türkiye, coğrafyası itibariyle hem hayvan yetiştiriciliğine uygunluğu ve hem de yüzyıllarca farklı medeniyeti barındırmasından dolayı peynir çeşitliliği açısından zengin bir ülkedir (akmakı ve Salık, 2021). Popüler olan Kaşar peyniri, Beyaz peynir, Tulum peyniri dışında Antep, Otlu, Urfa, Hellim, Ezine gibi de birçok peynir çeşidi bulunmaktadır. Bu peynirlerin bazıları yapıldığı yerin adını alırken, bazıları ise içeriği ile adlandırılmaktadır (izelge 2.1). Dünyada da binlerce çeşidi olan peynirin sınıflandırılması; kullanılan süte (inek, koyun, keçi, manda), üretim yöntemine (rennet/peynir mayası, ekşi süt peyniri, ultrafiltrasyon), kıvamına (taze, yumuşak, yarı yumuşak, yarı sert, sert, ekstra sert peynir), yağ içeriğine (eyrek yağlı, yarım yağlı, dörtte üç yağlı, tam yağlı, kremalı, çift kremalı peynir), fermentasyon tipine (laktik asit, laktik ve propiyonik asit, bütirik asit), yüzeyine (sert, yumuşak, lekeli, küflü) ve iç yapısına (gözenek, kf) göre yapılabilmektedir. Ayrıca, peynirler tat ve bazı biyoaktif bileşenler açısından da farklılık göstermektedirler. Bu bileşenler genellikle farklı olgunlaşma aşamalarındaki ana bileşenler olan laktoz, protein ve yağın fermentasyon, proteoliz ve lipoliz yoluyla parçalanmasıyla oluşmaktadır. Bu süreçler, peynirin aromasını, dokusunu ve besin değerini belirleyen moleküler düzeydeki değişiklikleri içermektedir (Walther vd. 2008).

Çizelge 2.1 Türkiye’deki bazı peynir çeşitlerinin sınıflandırılması (Phelan vd. 1993)

Peynir adı	Yapısı
Beyaz Peynir	Koyun sütünden veya süt karışımlarından yapılan salamurada olgunlaştırılan yarı sert peynir
Mihaliç Peyniri	Çiğ koyun sütünden yapılan ve salamurada olgunlaştırılan sert peynir
Tulum Peyniri	Koyun sütünden veya süt karışımlarından yapılan sert peynir

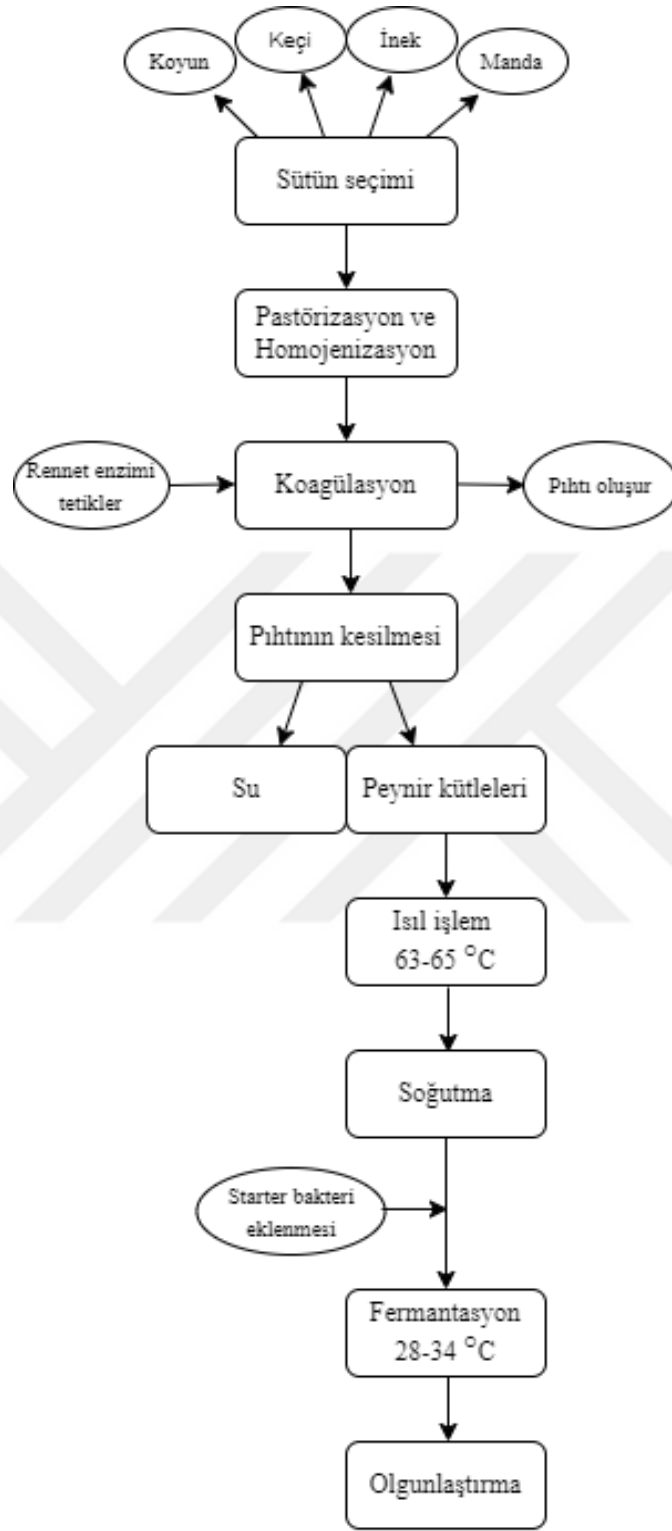
2.1.1 Peynir üretimi

Peynir üretiminde ilk aşama, kullanılacak sütün seçimidir. Bu amaçla genellikle koyun, keçi, inek veya manda sütü kullanılmaktadır. Bu sütlerin her biri farklı moleküler bileşenlere sahip olduğu için, bunlardan üretilen peynirlerin tat, doku ve besin içeriği de farklılık göstermektedir. Süt, peynir yapımına başlamadan önce bazı işlemlerden geçmektedir. Bu işlemlerden biri olan pastörizasyon, sütü mikroorganizmalardan arındırırken, homojenizasyon, sütteki yağ globüllerini daha homojen bir dağılım sağlamak için parçalamaktadır. İkinci sırada gelen koagülasyon aşaması, peynir yapımının en önemli adımlarından biridir. Bu aşamada, sütte bulunan proteinler (genellikle kazeinler) birbirine bağlanarak pıhtı oluşturmaktadır. Pıhtı oluşumu, rennet enzimi tarafından tetiklenmektedir (Fox vd., 1996). Bu enzim kimozin, pepsin ve lipaz gibi enzim türlerini de içermektedir. Rennet, pıhtılaşmayı başlatarak kazein proteinlerinin yapılarını değiştirmekte ve birbirine bağlanmalarını sağlamaktadır. Oluşan pıhtı, bıçak veya başka bir kesim aracıyla kesilerek su ve peynir kütlelerine ayrılmaktadır. Peynir kütlelerinin yoğunluğunu arttırmak için peynirin daha fazla suyunun çıkarılması, ısıtılıp işlenerek sağlanmaktadır. Bir sonraki aşama olan fermentasyon aşamasında, peynirin tadı ve aroması büyük ölçüde belirlenmektedir. Ayrılan peynir kütleleri, belirli mikroorganizmalarla muamele edilerek fermentasyona bırakılmaktadır. Bu mikroorganizmalar, sütün şekerlerini fermente etmekle beraber, asit ve diğer aromatik bileşiklerin oluşumuna da katkıda bulunmaktadır. Son olarak, olgunlaşma aşamasında belirli bir süre beklenmektedir. Bekleme süresi, peynirin çeşidine göre farklılık

göstermektedir. Bazen haftalar veya aylar sürebilmektedir. Bu süre boyunca peynirin tadı, dokusu ve aroması gelişmektedir (Fox vd 1996).

Peynir üretiminde kullanılacak sütün asitliğinin, pastörizasyon ve pıhtılaşma evresi arasında belirli bir seviyeye (pH 6,3-6,5) getirilmesi gerekmektedir. Çünkü pastörizasyon aşamasında bazı enzimler inaktif hale gelmekte ve olgunlaşma sırasında önemli rol oynayacak birçok mikroorganizma canlılığını kaybetmektedir. Bu nedenle starter kültür katılımı da, pastörize edilen ve fermentasyon sıcaklığına (28°C-34°C) soğutulan süte yapılmaktadır (Fox vd 1996).

Peynirin nihai olarak tüketici tarafından kabul edilebilir olması büyük ölçüde duyuşal özelliklere (lezzet, aroma) bağılıdır. Peynirin bu özellikleri ise, onu oluşturan çeşitli bileşiklere ve moleküllere göre değişiklik göstermektedir. Bu bileşiklerin ve moleküllerin varlığı da iklim, coğrafi konum, kullanılan teknoloji ya da olgunlaşma koşulları gibi peynir yapım sürecindeki faktörlerle ilişkilidir. Dolayısıyla peynir yapımında kullanılan starter kültür içeriğı, peynir kalitesi ve aromasının belirlenmesinde kilit rol oynayan bir etmendir (Buffa vd. 2004, Soggiu vd. 2016, Pino vd. 2018).



Şekil 2.1 Temel peynir üretim aşamaları

2.2 Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB); asit toleranslı, organotrof (enerjisini organik bileşiklerden alan), fakültatif anaerob, sitokromlardan yoksun, dolayısıyla porfirinleri sentezleyemeyen, oksidaz ve katalaz negatif, vitaminler ve aminoasitler gibi büyüme faktörlerine ihtiyaç duyan, karbonhidrat fermentasyonu ile temel son ürün olarak laktik asit üreten, spor üretimi yapamayan (*Sporolactobacillus inulinus* hariç), hareketsiz, kok veya çubuk şeklinde Gram pozitif mikroorganizmalardır (König ve Fröhlich 2009). Bu bakteriler çok çeşitli yerlerde bulunabilmektedir. Örneğin; fermente gıdalarda, insan ağız, nazofaringal mukoza, bağırsak ve vajina mukozasında, hayvanların ürogenital ve gastrointestinal sistemlerinde, ekolojik olarak da su ve toprak gibi ortamlarda yer alabilmektedirler.

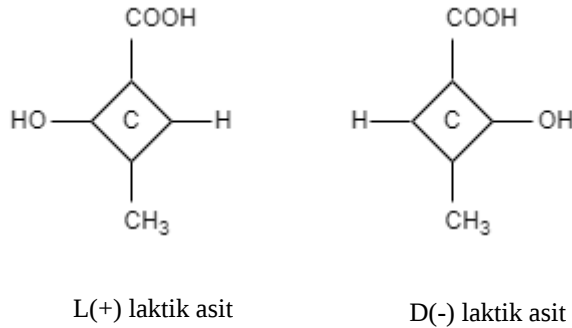
Laktik asit fermentasyonunun bilimsel olarak keşfedilmesi, İsveçli Carl Wilhelm Scheele tarafından, 1780 yılında, fermentasyona uğramış süttten laktik asidin izole edilmesi ve kimyasal karakterizasyonu ile başlamıştır. Daha sonralarında Louis Pasteur'un laktik asit fermentasyonu ile ilgili 1857'de yayınladığı makalede, söz konusu fermentasyonun nedeninin bakteriler olduğunu kanıtlamıştır. İlk bakteriyel saf kültür ise, Joseph Lister tarafından 1873'te tesadüfen elde edilmiştir. Lister, bu bakteriyi '*Bacterium lactis*' olarak tanımlamıştır. Fakat Felix Löhnis 1909'da bu bakteriyi '*Streptococcus lactis*' olarak tekrar adlandırmıştır. Şu anda kabul edilen adı ise, Karl-Heinz Schleifer'in son sınıflandırmasına (1987) göre *Lactococcus lactis*'dir. Pasteur ve Lister'in deneylerine dayanarak, Wilhelm Storch ve Hermann Weigmann, 1890 yılında, ekşi süt ve peynir fermentasyonlarından sorumlu olan laktik asit bakterilerini, kendiliğinden fermente olmuş süt ve kremadan izole eden ilk kişilerdir. İzolasyon sonucunda, Weigmann tarafından, 1905-1908 yılları arasında ortaya atılan, süt endüstrisi için saf kültürler üretmek amacıyla kullanılacak olan 'starter kültür' kavramı doğmuştur (Teuber 1993).

2.2.1. Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması

LAB'nin taksonomisinde öncü olarak bilinen Orla-Jensen, 1919 yılında yapmış olduğu çalışmada, bu bakterilerin sınıflandırılmasıyla ilgili net bir farklılaşma içeren bir

sistem önermektedir. Bu sistemde; şeker fermentasyonu, gaz oluşumu (homolaktik, heterolaktik), morfoloji (kok veya basil), oksijene karşı davranış ve (katalaz pozitif veya negatif) optimum büyüme sıcaklığı (mezofilik, termofilik) temelinde bir sınıflandırma yapılmaktadır. Orla-Jensen'in bu sistemi, son 20 yılda ortaya çıkan evrim ağaçlarının önerilmesine kadar esas alınmış ve taksonomik gruplandırmalar yapılmıştır. Günümüzde tür ve suşa özgü nükleotid dizileri içeren oligonükleotitlerinin oluşturulmasıyla tanımlama işlemi hızlı ve kolay bir şekilde yapılmaktadır. Fakat pratik uygulama açısından Orla-Jensen'in şeması hala çok değerlidir ve rutin bakteriyolojik laboratuvarlarda kolayca belirlenebilen özellikler kullanılarak tanımlamalar yapılmaya devam edilmektedir (Teuber 1993).

Laktik asit bakterileri, ilk olarak, glikozun fermentasyonundan laktik asidin çeşitli izomerlerini oluşturma yetenekleriyle karakterize edilmiştir. Laktik asit, fermentasyon sonucu ortaya çıkmaktadır ve optik olarak ışığı döndürme yeteneğine göre üçe ayrılmaktadır. Eğer dönme sağa doğru ise Dekstro (D), sola doğru ise Levo (L), hem D hem de L'nin bir karışımı varsa (DL) rasemik olarak adlandırılmaktadır (Carr vd. 2002) (Şekil 2.2).

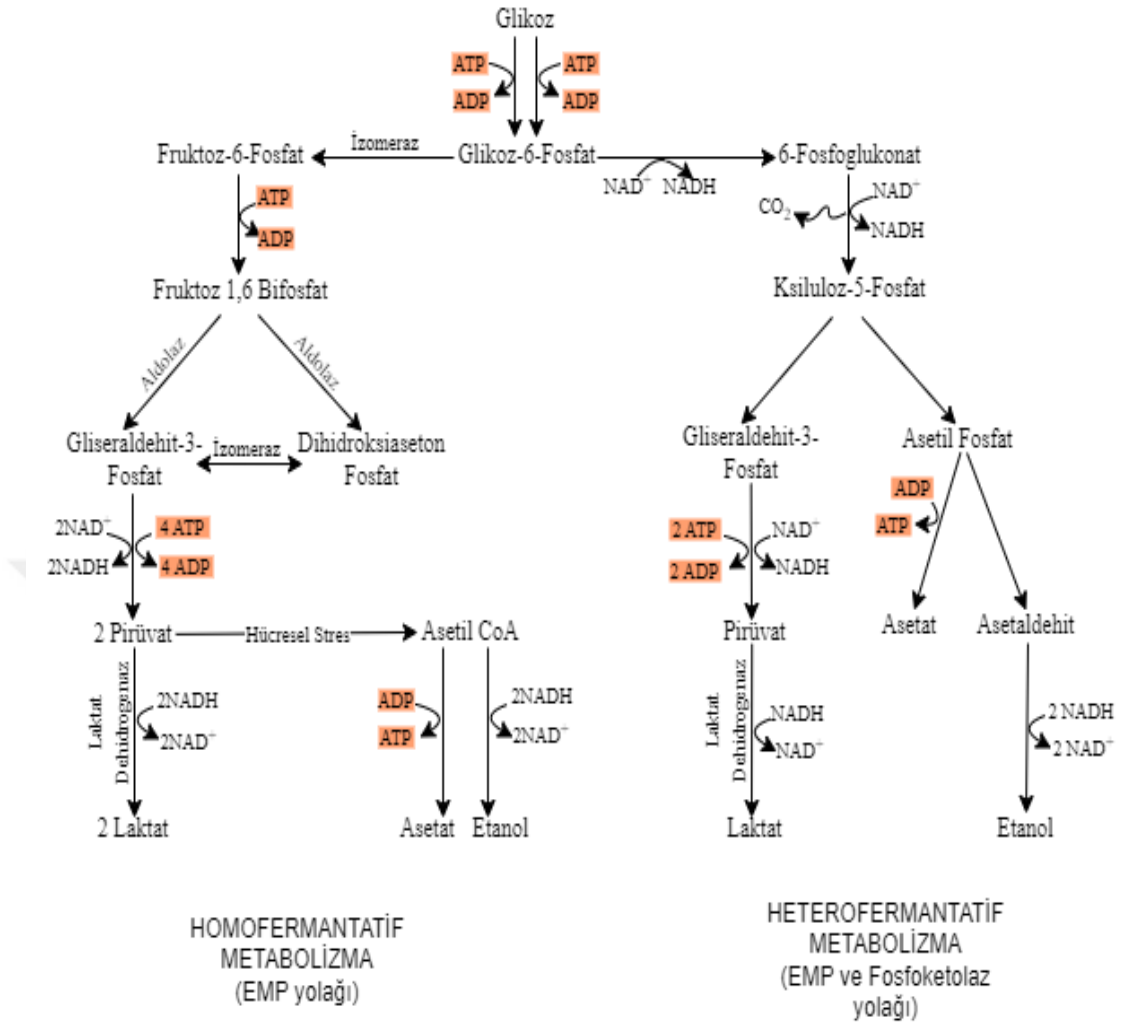


Şekil 2.2 Laktik asit izomerleri

LAB, fermentasyondaki büyüme optimumlarına göre ikiye ayrılmaktadır. Büyüme sıcaklığı 20-30°C arasında olan LAB'ne mezofilik, 30-45°C arasında olan LAB'ne ise termofilik adı verilmektedir (Rakhmanova vd. 2018). Mikroskopik morfolojilerine göre de ikiye ayrılan bu bakteriler yuvarlak bir biçime sahipse kok, çubuk şeklindeyse basil adını almaktadırlar.

LAB, farklı cinslerden oluşsalar da, heksoz fermentasyonunun (glikoliz) son ürününe göre homofermenterler ve heterofermenterler olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Homofermenterler, glikoliz sonucu ana ürün olarak laktik asit üretmektedirler. Heterofermenterler ise, laktik asit üretmek dışında, karbondioksit, asetik asit ve etanol gibi bileşikler de açığa çıkartmaktadırlar. Homofermenterler, aldolaz ve heksoizomeraz enzimlerine sahiplerdir ve Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) diğer bir adıyla Fruktoz-di-fosfat metabolik yolunu doğrudan kullanarak, 1 molekül glikozdan 2 molekül laktik asit fermente edebilmektedirler. Heterofermenterler, fosfoketolaz enzimine sahiplerdir ve glikoliz için alternatif Pentoz-Fosfat diğer bir adıyla Heksoz-Monofosfat metabolik yolunu kullanmaktadırlar. Fosfoketolaz enzimi, bu yol ile, altı karbonlu (heksoz) şekeri, beş karbonlu (pentoz) şekere indirgemektedir. Bu süreçte, asetaldehit ve diasetil gibi ortaya çıkan organik bileşikler, üretilmek istenen gıda maddelerinin kendilerine has olan aroma, tat ve doku özelliklerini belirlemede önemli bir rol oynamaktadır. Dolayısıyla heterofermenterler, homofermenterlere göre süt endüstrisinde daha sıklıkla kullanılmaktadır (Carr vd. 2002) (Şekil 2.3).

Peynirin olgunlaşma aşamasında meydana gelen değişimlerden birisi olan fermentasyon, laktozun laktik aside dönüşmesiyle oluşmaktadır. Laktozun neredeyse tamamı birkaç gün içinde laktik aside dönüşmektedir. Ortamdaki heterofermantatif laktik asit bakterileri, laktik asit dışında oluşturduğu asetik asit, etil alkol, propiyonik asit, formik asit, asetaldehit, diasetil ve CO₂ gibi moleküller ile peynirin dokusunu, tadını vs. etkilemektedir. Peynirin yapısı farklı asidik pH düzeylerinden de etkilenmektedir. Bu sebeple, sert ve yarı sert peynirlerin pH aralığı 5.0-5.2 olurken, yumuşak peynirlerin pH aralığı 4.6'ya kadar düşebilmektedir. Peynirdeki göz oluşumu ise fermentasyondaki CO₂ üretimiyle belirlenmektedir (Fröhlich-Wyder 2004).



Şekil 2.3 Homofermantatif ve heterofermantatif metabolizma yolakları (Cheah vd. 2002'den esinlenilmiştir)

2.2.2 Laktik asit bakterilerinin starter kültür olarak kullanımları

Fermente edilmiş gıdalar, starter kültür olarak kullanılıp kullanılmama durumuna göre endüstriyel ve geleneksel (antisanal) olmak üzere iki başlık altında toplanabilmektedir. Starter kültürün kullanılmadığı ve fermantasyonun tamamen hammaddedeki ve etrafındaki LAB türleriyle gerçekleştiği fermantasyona, geleneksel fermantasyon adı verilmektedir. Endüstriyel gıda üretimi ise, LAB türlerinin, starter kültür veya ilave (adjunct) kültür olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilmektedir (Burns vd. 2012). Sütün fermantasyonuyla meydana gelen ve endüstriyel olarak da üretilebilen peynirin, üretim ve olgunlaşma aşamalarında, mikroorganizmalar, özellikle de LAB kültürleri önemli rol

oynamaktadır. Bu mikroorganizmalar da starter kültür ve ikincil flora olarak ikiye ayrılabilir. Peynir üretiminde, laktozu fermantasyona uğratarak laktik asit üretilmesini sağlayan mikroorganizmalar, starter laktik asit bakterileri olarak adlandırılmaktadır. Starter denmesinin nedeni, laktik asit üretimini başlatmalarıdır. Bu bakteriler aynı zamanda olgunlaşma aşamasına da katkıda bulunmaktadır. İkincil flora ise, neredeyse tüm olgunlaşmış peynirlerde ortak olarak bulunan, ancak starter özelliği taşımayan bakterileri, mayaları ve küfleri içermektedir. Bu mikroorganizmalar, peynir üretimi esnasında, laktik asit üretimine fazla katkıda bulunamazlar da, olgunlaşma sürecinde önemli rol oynamaktadırlar (Beresford vd. 2001). Starter olmayan (ikincil flora üyeleri) laktik asit bakterileri, peynirin spesifik özelliklerini yani tat, doku, aroma ve yapısını geliştirmeye, özellikle katkıda bulunmaktadır. (Antonsson vd. 2003). Olgunlaşmamış olan peynirler haricindeki, herhangi bir süre olgunlaşmış bütün peynirler, starter olmayan laktik asit bakterileri içermektedir. Genellikle fakültatif heterofermantatif laktobasilleri, bilhassa da *Lactobacillus casei* ve *L. paracasei*'yi bulundurmaktadırlar. Ancak bazen *Pediococcus* spp. ve zorunlu heterofermantatif *Lactobacillus* spp.'yi (*Lactobacillus brevis* ve *L. fermentum*) de ikincil flora olarak içerebilmektedirler (Hayaloğlu, 2016).

Starter kültürlerin başlıca rolü, sütü asitleştirmek ve böylece istenmeyen bakterilerin çoğalmasını engellemektir. Patojen bakterileri inhibe etme özellikleri sayesinde de ürünün raf ömrünü uzatmaktadırlar. Böylece, mikrobiyolojik olarak güvenli ürünlerin üretilmesi sağlanmaktadır. Yüksek kaliteli peynir elde etmek için ise asidin optimum miktarda ve zamanda üretilmesi gerekmektedir (Fox vd. 2017a). Ayrıca starter kültürler, peynirde, tuz ve nem seviyesi açısından uygun peynir mayası enzimi aktivitesine ve ikincil mikroorganizmaların büyümesine engel olmayacak şekilde bir ortam oluşturmalarıdır. Starter kültürün bilinçli olarak eklenmesiyle üretilen peynirlerde, starter kültürün asit üretme oranı ve fajlara karşı duyarsız olması da LAB'nin seçim kriterleri arasında yer almaktadır. Tüm bu sebeplerden dolayı, starter kültürlerin doğru seçimi, peynir üretiminin sonuna kadar olan süreçte, tekrarlanabilir organoleptik ve yapısal özelliklere sahip ürünler elde etmek için çok önemlidir (Coelho vd. 2002).

En yaygın kullanılan starter kültürler; *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Enterococcus* cinslerinin üyeleridir. Bu kültürler, kullanıldıkları inkübasyon ve üretim sıcaklıklarına göre mezofilik (optimum 30°C) ve termofilik (optimum 40-45°C) olarak kategorize edilebilmektedirler. Mezofilik starter kültürler, daha çok *Lactococcus* ve *Leuconostoc* cinslerini içermektedir (Coelho vd. 2002). Termofilik starterlar ise *Str.thermophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. casei* ve *Lb. Plantarum* gibi türleri içermektedir (Fox vd. 2017b).

2.2.3 Laktik asit bakterilerinin probiyotik olarak kullanımları

Probiyotik terimi, Latince'den köken almış olup 'yaşam için' anlamına gelmektedir. Yıllar geçtikçe probiyotik mikroorganizmalarla ilgili çalışmalar çoğalmakta ve bu mikroorganizmalar hakkında daha fazla bilgiye ulaşabilmekteyiz. FAO/WHO, probiyotikleri, 'yeterli miktarlarda uygulandığında konakçıya sağlık açısından fayda sağlayan canlı mikroorganizmalar' olarak tanımlamaktadır (FAO/WHO, 2002). 20. yüzyılın başlarında, probiyotiklerin faydalı etkilerine dair ilk çalışmaları yapan Nobel ödüllü Rus bilim adamı Elie Metchnikoff, bu çalışmasıyla, laktik asit bakterileriyle bağırsak mikrobiyotası arasındaki ilişkiyi görünür hale getirmiştir. Metchnikoff'a göre saçların kırılması, buruşukluklar, kırışıklıklar, unutkanlık ve güçsüzlük, dost fagositlerin (beyaz kan hücreleri) bağırsak kaynaklı toksinlerle birlikte zararlı hale gelmesiyle ilgiliydi. Bağırsaktaki zararlı mikroorganizmaların ortadan kaldırılmasıyla yaşlanmanın geriye döndürülebileceğine inanmaktaydı. Ayrıca Metchnikoff, süt ve süt ürünlerini çokça tüketen Kafkas ve Bulgar köylülerinin uzun bir yaşam sürdüğünü gözlemlemişti. Bunlara bağlı olarak, fermente süt ürünleri sayesinde, bağırsaktaki fermentasyonun arttığını ve aşırı laktik asit oluştuğunu söyleyen Metchnikoff, bu olayın zararlı mikroorganizmaların çoğalmasını inhibe ettiğini ısrarla belirtmekteydi (Özden 2006). Ferdinand Vergin ise, probiyotik terimini makalesinde geçiren ilk bilim insanıydı. 'Anti-und Probiotika' (antibiyotik ve probiyotik) isimli makalesinde, antimikrobiyal maddeler ile patojen olmayan, yararlı bakterilerin ilişkisini anlatmaktadır (Corthier 2004).

Probiyotik mikroorganizmaların birçoğu, patojenitesi olmayan çeşitli bakteri ve maya türlerini içermektedir (Holzapfel 2001). Gram pozitif veya negatif olabilen bu bakteriler, genellikle sporsuz (*Bacillus* spp. hariç) ve morfolojik olarak da basil veya kok şeklinde bakterilerdir. Söz konusu mikroorganizmaların bazıları, insan sindirim sisteminde doğal olarak bulunmakta ve bağırsaklarda olması istenmeyen bakterilerin çoğalmasını kontrol ederek, doğal florayı denge halinde tutmaktadırlar (Araújo vd. 2012). Çoğunluğu laktik asit bakterilerini (en çok *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerinin üyeleri) içeren probiyotikler, bakteriler haricinde, bir maya olan *S.boulardii*'yi de içermektedirler (Çizelge 2.2). *S.boulardii*, ilk defa Dr. Boulard tarafından, tropikal bir meyvenin kabuk kısmından izole edilen bir maya mantarıdır (Reid ve Bocking 2003). GİS'de ince bağırsakta en çok miktarda kolonize olan laktik asit bakterileri, *Lactobacillus* türleridir. *Bifidobacterium*'lar ise daha çok kalın bağırsakta bulunmaktadır. Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak kabul edilmesi için belirli şartları karşılaması gerekmektedir. Bu kriterler Şekil 2.4'de gösterilmektedir.

LAB, düşük pH, pepsin, pankreatin ve safra tuzları gibi gastrointestinal sistemdeki zorluklara karşı direnme yetenekleriyle bilinmektedirler. Bu bakteriler, sindirim sistemindeki zorlu koşullara dayanıklılıkları nedeniyle, fonksiyonel ve probiyotik ürünlerin geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadırlar. Probiyotik olarak hayatta kalmaları ve işlevsellikleri, onların gastrointestinal sistemden geçerek bağırsaklarda faydalı etkilerini göstermelerini sağlamaktadır. Direnç yetenekleri, patojenik bakterilere karşı antimikrobiyal özellikleriyle birlikte, onları probiyotik uygulamalar için değerli adaylar yapmaktadır (Conway vd. 1987).

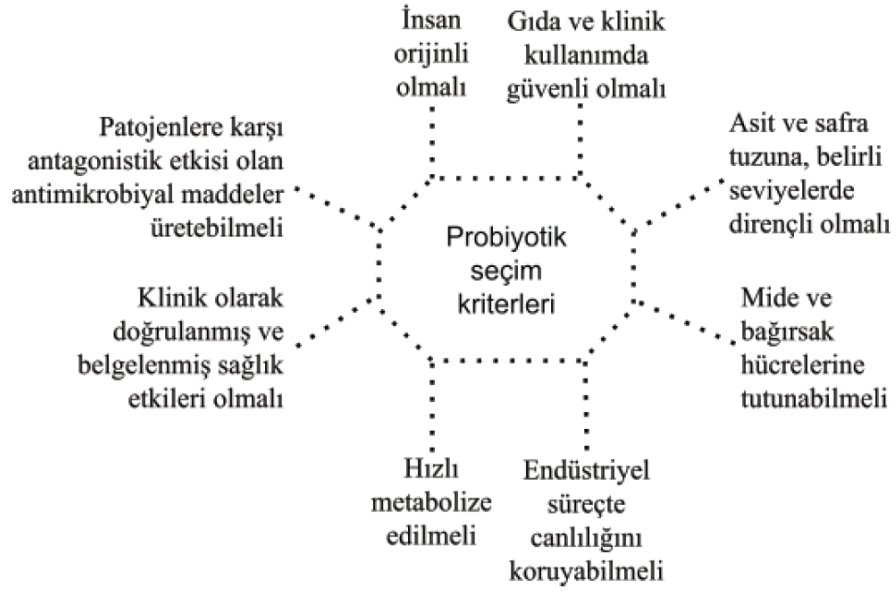
LAB'nin bağırsak yüzeylerine yapışmaları için, otoagregasyon ve koagregasyon yetenekleri de çok önemlidir. Söz konusu bakterilerin, potansiyel patojenlerle koagregasyonu, zararlı bakterilerin bağırsakta kolonize olmasını engellemeye yardımcı olmaktadır (Dias vd. 2013). Bu etkileşimler, laktik asit bakterilerinin, probiyotik etkilerine katkıda bulunmaktadır. Söz konusu etkileşimler arasında, bağırsaklarda besinler ve alan için patojenlerle rekabet etme yeteneği önemli bir yer tutmaktadır (Wedajo 2015). LAB'nin yüksek hidrofobiklikleri, bağırsak mukozasına karşı güçlü bir

afinite kazanmalarını sağlayarak, kolonizasyon potansiyellerini ve probiyotik işlevselliklerini arttırmaktadır (Shao 2023).

LAB'nin, Caco-2 hücrelerine yapışması, birçok çalışmanın odak noktası olmuştur ve bulgular, LAB suşlarının bu hücrelere yapışabileceğini ve sitokin salgılanmasını modüle edebileceğini göstermiştir (Feng vd. 2016). Caco-2 hücrelerine yapışma, konak-mikrop etkileşimlerini etkileyen ve bağırsak bariyerine koruma sağlayan potansiyel bir probiyotik belirteç olarak kabul edilmektedir (Sharma ve Kanwar 2017). Bazı LAB izolatlarının, ilaçlara dirençli *Salmonella* suşları üzerinde inhibitör etkiler gösterdiği, Caco-2 hücrelerini istiladan koruduğu ve yangı ile ilişkili belirli genlerin ekspresyonunu azalttığı gözlemlenmiştir (Hai vd. 2021).

Çizelge 2.2 Probiyotik olarak tanımlanan belli başlı mikroorganizmalar (Holzapfel vd. 2001)

Lactobacillus türleri	Bifidobacterium türleri	Pediococcus türleri	Diğer LAB türleri	LAB olmayan türler
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>P. cerevisiae</i> ,	<i>E. faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyo</i>
<i>Lb. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>P. acidilactici</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> nissle
<i>Lb. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>L. lactis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>Lb. crispatus</i>	<i>B. breve</i>		<i>Leu. mesenteroides</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>		<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	<i>S. boulardii</i>
<i>Lb. gallinarum</i>	<i>B. lactis</i>		<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>Lb. gasseri</i>	<i>B. longum</i>			
<i>Lb. johnsonii</i>				
<i>Lb. paracasei</i>				
<i>Lb. plantarum</i>				
<i>Lb. reuteri</i>				
<i>Lb. rhamnosus</i>				



Şekil 2.4 Probiyotik seçim kriterleri

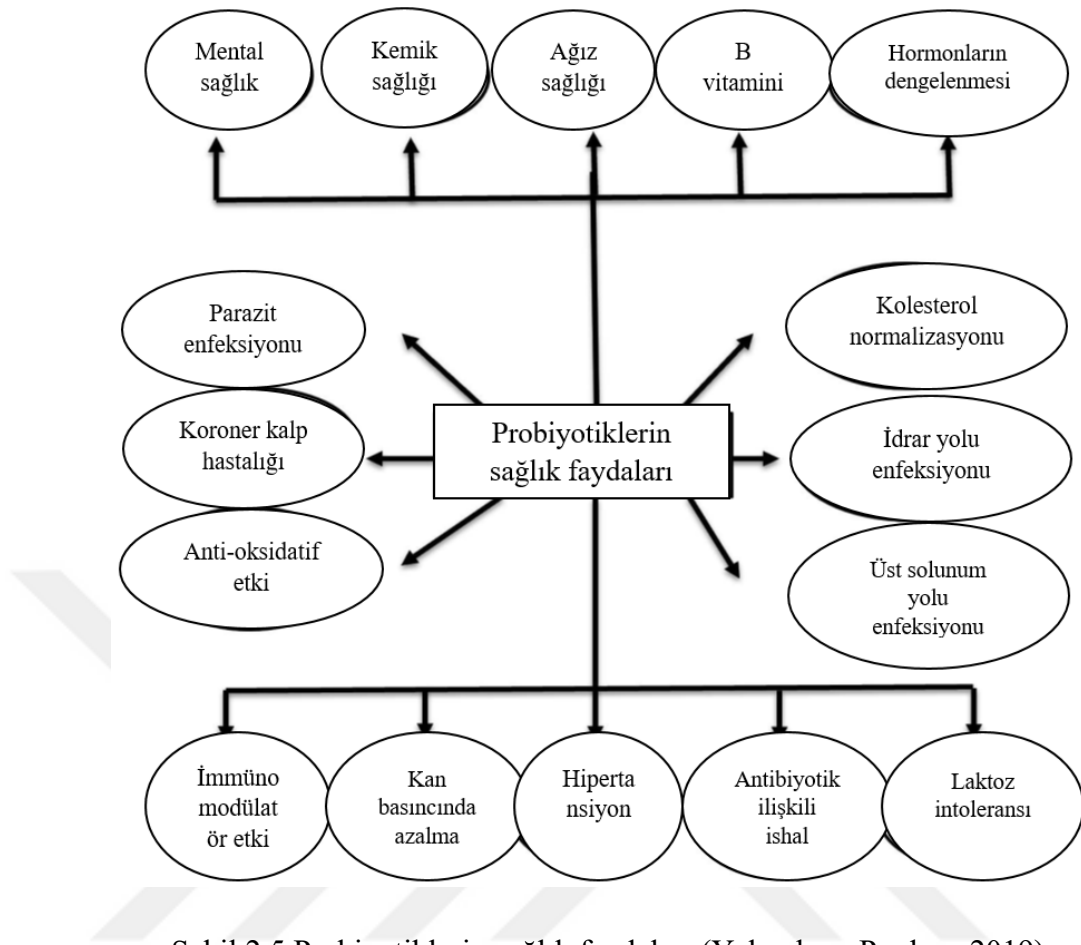
Bu kriterleri karşılayan ve probiyotik adı verilen laktik asit bakterilerinin bulunduğu gıda ürünlerinin içeriğinde, tüketici üzerinde sağlık açısından faydalı olabilmesi için, yeterli konsantrasyonda LAB bulunmalıdır. Bahsi edilen miktarın, yapılan çalışmalar neticesinde, probiyotik mikroorganizmaların sağlık yararlarına göre değiştiği belirlenmiştir. Minimum geçerli seviye olarak 10^5 kob/gr tavsiye edilmektedir (Shah vd. 1995). Bununla birlikte, nihai gıda ürünündeki (işlenmiş gıda) probiyotik kültürlerin etkili düzeyleri, 10^6 - 10^7 kob/gr olarak tanımlanmıştır (Talwalkar vd. 2004). Zira bu sayı, günlük 100 gr veya 100 mL probiyotik gıda tüketimi ile 10^8 - 10^9 kob'a ulaşmakta ve böylece insan sağlığı için etkin konsantrasyona ulaşmaktadır (Jayamanne vd. 2006).

Starter kültür olarak faydalanabildiğimiz LAB'i, fermente süt ve yoğurtlara eklenerek, probiyotiklerin taşınmasında ana araçlar olarak kullanılmaktadır. Fakat bu probiyotiklerin, sağlığa fayda sağlaması amacıyla, gıda ürününde, depolama veya olgunlaşma süreçleri boyunca canlılıklarını sürdürebilmeleri beklenmektedir. Bu hedef doğrultusunda, probiyotiklerin yüksek seviyede bulunması ve canlılığını koruyabilmesi için uygun olan optimum bir ortam sağlanmalıdır. Yoğurt ve fermente sütlerin yanı sıra peynir de probiyotiklerin taşınması için kullanılan ve daha yüksek pH'a, daha katı kıvamı

ve nispeten daha yüksek yağa sahip olan bir gıda ürünüdür. Peynirde bulunan bakterilerin metabolik aktiviteleri, peynirin olgunlaşması sürecinde birkaç hafta içinde anaerobik probiyotik mikroorganizmaların gelişimini ve canlılığını destekleyen bir ortam olmaktadır. Bu özellikleri sebebiyle, diğer ürünlere kıyasla peynir, mikroorganizmaların canlılığını uzun süre koruma açısından daha fazla katkıda bulunmaktadır. Çoğunlukla, peynirlerin pH seviyesi (pH 4.8-5.6), fermente süt ürünlerinin pH seviyesine (pH 3.7-4.3) göre daha yüksektir. Bu durum, asit duyarlı probiyotik mikroorganizmaların uzun süre canlı kalmasını sağlayarak, daha stabil bir ortam sunmaktadır (Gürsoy ve Kınık 2006). Ayrıca peynirin asit nötralizasyon kapasitesi, yoğurda göre daha yüksektir. Örnek vermek gerekirse; gastrik sıvıya 5 gr peynir eklendiğinde pH değeri 2'den 4.74'e yükselirken, 5 mL yoğurt eklendiğinde pH değeri 2'den 3.65'e yükselmektedir (Gardiner vd. 1999, Ross vd. 2002).

Probiyotik mikroorganizmalar, çeşitli peynir türlerinin üretiminde başarıyla kullanılmaktadır. Peynirlerde probiyotik bakterilerin eklenmesinin başarısı, kullanılan tür ve suşa, üretim aşamasında kullanılan LAB aktivitesine, peynirin kompozisyonuna ve üretim ile olgunlaşma koşullarına bağlı olarak değişmektedir. Pratik uygulamada, peynir üretiminde en sık karşılaşılan probiyotik mikroorganizmalar genellikle Bifidobakteriler ve Laktobasiller olarak belirlenmektedir. Probiyotik peynir üretiminde kullanılacak suşların titizlikle seçilmesi de, peynir matrisindeki probiyotik bakterilerin canlılığını koruması ve devam ettirebilmesi açısından kritik bir faktördür (Gürsoy ve Kınık, 2006).

Probiyotiklerin sağlığa faydaları arasında; laktoz intoleransının hafifletilmesi, ishalin önlenmesi veya azaltılması, alerjilerin önlenmesi, mutajenite ve kanserojenite ile ilişkili riskin azaltılması, kolesterolün azaltılması, bazı mide ülserlerinin ve diğer bağırsak patojenlerine sebep olan *Helicobacter pylori*, *Streptococcus* türleri, *E. coli*, *S. Typhimurium*, *Clostridium difficile* gibi mikroorganizmaların inhibisyonu, iltihaplı bağırsak hastalığının önlenmesi ve bağışıklık sisteminin modülasyonu bulunmaktadır (Fox vd. 2017a) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Probiyotiklerin sağlık faydaları (Yakoob ve Pradeep 2019)

2.2.3.1 *Pediococcus* türleri

Pediococcus cinsinin ilk tanımı, Wochnschre F. Balcke tarafından, 1884'te yapılmıştır. Pediokoklar, Gram pozitif, katalaz üretmeyen, fakültatif anaerobik, homofermantatif, hareketsiz ve spor oluşturmeyen laktik asit bakterileridir ve *Lactobacillales* takımının *Lactobacillaceae* ailesi içerisinde sınıflandırılmaktadırlar. Kok morfolojisine sahip olan bu bakteriler, iki simetri düzlemi boyunca bölünmeleri sonucunda spesifik tetradlar oluşturmaktadırlar. Bu mikroorganizmalar, sitokromlardan yoksundur ve katalaz negatiftir (Carr vd. 2002).

Bira, bitki ve bazı fermente gıdalarda (peynir, şarap, turşu) bulunan pediokoklar, önceleri tek tür olarak (*P. cerevisia*) sınıflandırılmıştır. Fakat daha sonrasında yapılan araştırmalar neticesinde, biradan izole edilen pediokok *P. damnosus*, bitkiden izole edilen pediokok

ise *P. pentosaceus* olarak tanımlanmıştır (Yörük ve Güner 2011). Bu cinsin gıda ve süt ortamlarında en yaygın olarak bulunan iki türü ise *P. pentosaceus* ve *P. acidilactici*'dir (Banwo vd. 2013).

LAB üyesi olan *Pediococcus* spp.'nin, gıda ve sağlık endüstrisindeki uygulamaları sonucunda, antimikrobiyal peptitlerin (bakteriyosinler) üretiminde etkili olduğu gösterilmiştir. Bakteriyosinlerin üretimi, biyokoruma süreçlerinde kullanımı ve son zamanlarda insan ve veteriner hekimliğinde kullanımları üzerine çok sayıda çalışma yayınlanmıştır. En yaygın olarak kullanılan ikinci bakteriyosin, çeşitli *Pediococcus* suşları tarafından üretilen ve gıda endüstrisinde kullanılan pediocin PA-1'dir. Özellikle Gram pozitif patojenlerin, bilhassa da *Listeria monocytogenes*'lerin neden olduğu kontaminasyonu önlemek ve kontrol etmek için bir biyokoruyucu olarak kullanılmaktadır. Bu sayede ürünün raf ömrü uzamakta ve ürün, tüketim için güvenli bir hale gelmektedir (Todorov vd. 2023).

P. acidilactici'nin üzerinde yürütülen bir çalışmada, bu bakterinin prediyabet (PreD) ve Tip II Diyabet (T2D) tedavisinde taşıdığı potansiyel, özellikle açlık kan şekerinin ve diğer faktörlerin düzenlenmesi üzerindeki etkileri incelenerek değerlendirilmiştir. Bu araştırmada, yüksek yağlı diyet (HFD) ile beslenen iki grup erkek farenin (birinci grubun diyetinde plasebo, ikini grubun diyetine ise *P. acidilactici* pA1c suşu ilave edilmiş) vücut indeksleri karşılaştırılmıştır. HFD'nin, lokal enflamasyonu indükleyerek ve bağırsak geçirgenliğinin artmasını tetikleyerek, yüksek kan şekeri seviyelerine ve disbiyozu neden olduğu bilinmektedir (Rohr vd. 2015). 12 haftalık çoklu vücut indekslerinin takibinden ve sabit doku örneklerinin (pankreas ve ince bağırsak) analiz sonuçlarından, pA1c'nin açlık kan şekeri düzeylerini iyileştirdiği, insülin sekresyonunu desteklediği ve β -pankreatik adacık fonksiyonlarını koruduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca insülin salgılanması için hayati önem taşıyan GLP-1 inkretininin serum seviyesinin ve hepatik glukoz sentezinin, pA1c tedavisinden sonra arttığı saptanmıştır. pA1c'in aynı zamanda glukoz düzenleyici enzimler olan G6P, PEPCK ve GCK'nin ekspresyonunu da azaltarak glukoneogenezi düzenlediği de bu çalışmada tespit edilen önemli bir bulgudur. Genel olarak *P. acidilactici*, bağırsaktaki birden fazla faktörü düzenleyerek kan şekeri seviyelerinin kontrol edilmesine ve pankreasın korunmasına yardımcı olmaktadır. Bu da

onun Diyabet öncesi ve T2D hastaları için potansiyel bir koruma ve tedavi olabileceğine işaret etmektedir (Cabello-Olmo vd. 2022).

P. acidilactici üzerine yapılan başka bir çalışmada, söz konusu bakterinin bağırsak mikrobiyotasını ve metabolomunu nasıl etkilediği ve bunun da vücut için toksik olan ağır metallerin (HM) birikimini nasıl engellediği örneklenmiştir (Feng vd. 2022). Deney, 12 hafta boyunca; (1) HM'ye dirençli *P. acidilactici* GR-1 türü içeren probiyotik yoğurt veya (2) geleneksel yoğurt tüketen, metal endüstrisinde çalışan 76 işçiden oluşan iki grup üzerinde gerçekleştirildi. Geleneksel yoğurtla karşılaştırıldığında, HM'ye dirençli *P. acidilactici* GR-1 suşu içeren probiyotik yoğurt, daha düşük ağır metal seviyelerine ve gelişmiş serum biyokimyasal indekslerine dair kanıtlar göstermiştir. Probiyotiklerle ilgili daha fazla araştırma, yüksek ağır metal seviyelerine ve diğer toksik metal maruziyetine karşı etkili ve erişilebilir seçeneklerin önünü açacaktır. Deney, GR-1'in bağırsakların antioksidatif fonksiyonundaki metallere karşı koruyucu etkisini doğrulamıştır (Feng vd. 2022).

Hiperpigmentasyon, epidermis (cilt) parçalarının çevredeki cildin geri kalanından daha koyu olduğu, tipik olarak zararsız bir durumdur. Mikrobun, ciltte melanin birikmesinin neden olduğu hiperpigmentasyonla mücadele edip edemeyeceğini görmek için *P. acidilactici* PMC48 ile bir klinik çalışma gerçekleştirilmiştir. Deneme katılımcıları UV kaynaklı ışınlarla yapay olarak bronzlaştırılmış ve PMC48 doğrudan ciltlerine uygulanmıştır. 22 denekte 8 hafta süresince görsel değişiklikler, cilt parlaklığı ve melanin indeksi izlenmiştir. Deneme sonucunda PMC48 suşunun, hem cilt beyazlatmada hem de yapay olarak indüklenen pigmentli cildin melanin indeksini azaltmada önemli olumlu etkiler gösterdiği tespit edilmiştir. Bronz ten rengi yoğunluğunda % 7,647 azalma, cilt parlaklığında % 8,098 artış, melanin indeksinde % 11,818 azalma ve cilt neminde % 20,943 artış tanımlanmıştır. PMC48, hem in vitro hem de in vivo analizlerde hiçbir toksisite belirtisi göstermemiştir. Sonuçlar, *P. acidilactici*'nin kozmetik veya ilaç endüstrisinde ciltle ilgili bozukluklar veya tedavilerle mücadelede umut verici rolünü ortaya koymuştur (Park vd. 2023).

P. acidilactici üzerine yürütölen araştırmalarının çoğu, probiyotiklerin insan vücudunun iç sistemi üzerindeki potansiyel etkilerine odaklanmaktadır. Hongqu pirinç şarabından izole edilen *P. acidilactici* FZU106 suşunun, hiperlipidemi ve lipid metabolizması üzerindeki etkisinin incelendiği araştırmada; bu suşun yüksek yağlı diyetle indüklenen hiperlipidemik sıçanların karaciğerinde meydana gelen yıkıma veya lipid metabolize etme süreçlerine müdahale etme kapasitesi irdelenmiştir. Suşun, yağ asitlerini hücrelere taşıyan CD36'daki mRNA seviyelerini azalttığı ve böylece yağ asitlerinin alımını önlediği bulunmuştur. FZU106 tarafından önemli ölçüde düzenlendiği gözlemlenen diğer karaciğer genleri CD36, CYP7A1, SREBP-1c, BSEP, LDLr ve HMGCR olarak tespit edilmiştir. Araştırma bulguları, FZU106'nın lipid metabolizmasına ve oksidatif strese müdahale ederek vücut ağırlığındaki anormal artışlar gibi süreçleri inhibe edebildiğini kanıtlamıştır (Zhang vd. 2022).

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Peynir örnekleri

Araştırma kapsamında, Gaziantep'in Nizip ilçesinde (4 çeşit), Mardin ilinde (1 çeşit), Şanlıurfa ilinde (1 çeşit) ve Birecik ilçesinde (2 çeşit), geleneksel ürünlerin yapıldığı ve satıldığı köylerden temin edilen 8 adet, çeşitli, geleneksel yöntemlerle üretilen, işlem görmemiş peynir numuneleri toplanmıştır. Söz konusu numuneler, aseptik koşullarda alınmış ve soğuk zincir koşullarına dikkat edilerek, analiz zamanına dek +4°C'de saklanmıştır.

3.1.2 Bakteriler

Laboratuvara getirilen numunelerden izolasyonu gerçekleştirilen potansiyel laktik asit bakterilerinin antibakteriyel aktivitelerinin değerlendirilmesi amacıyla, çalışma grubumuz laboratuvarlarından temin edilen 8 adet indikatör bakteri suşu [*Bacillus cereus* ATCC 11776 (M28), *Escherichia coli* ATCC 25922 (M26), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (M32), *Klebsiella pneumoniae* (M48), *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (M27), *Pseudomonas aeruginosa* (M54), *Salmonella* Typhimurium 14028 (M43), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (M29)] kullanılmıştır. Bahsi geçen bakteriler, gliserol içeren (% 60), LB (Luria Broth) ve TSB (Tryptic Soy Broth) besiyerlerinde hazırlanarak, -20°C'de saklanmıştır. Biyolojik numuneler araştırma boyunca, gliserol içermeyen LB ve TSB besiyerlerinde 7 günde bir transfer yapılarak, aktif kültürler halinde muhafaza edilmiştir.

Probiyotik özellikleri araştırılmak üzere izolasyonu yapılan suşların üremesi ve izolasyonu için, de Man Rogosa Sharpe (MRS), M17, Kanamisin Eskülin Azid (KEA) ve Nutrient besiyeri kullanılmıştır. Bahsi geçen bakterilerin stok kültürleri, % 60 oranında steril gliserol eklenmiş, üremesine uygun olan MRS, M17 ve NB besiyerinde

hazırlanarak, -20°C’de saklanmıştır. Çalışma süresince numuneler, gliserol içermeyen MRS, M17 ve NB besiyerlerinde 7 günde bir, transfer yapılarak aktif kültürler halinde muhafaza edilmiştir.

3.1.3 Besiyerleri ve çözeltiler

Bu çalışmada kullanılan besiyerleri Çizelge 3.1.’de verilmiştir. Besiyerlerinin hazırlanmaları üretici firmaların talimatları doğrultusunda yapılmıştır.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan besiyerleri ve agar

Besiyeri ismi	Üretici Firma	Katalog Numarası
de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) Agar	Merck, Germany	1.10660
de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) Broth	Fluka, Germany	69966
M17 Broth	Merck, Germany	1.15029
Kanamycin Esculin Azide (KEA) Agar	Merck, Germany	1.05222
Nutrient Broth	Neogen, USA	7146A
LB Broth	Merck, Germany	1.10285
Tryptic Soy Broth (TSB)	Merck, Germany	1.05459
Agar	Applchem, Germany	A3477

MRS Agar	
Pepton	10.0
Et ekstraktı	8.0
Maya ekstraktı	4.0
D(+)-Glikoz	20.0
Dipotasyum hidrojen fosfat	2.0
Sodyum asetat trihidrat	5.0
Triamonyum sitrat	2.0
Magnezyum sülfat heptahidrat (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0.2
Manganez sülfat tetrahidrat (MnSO ₄ .4H ₂ O)	0.05

*Ekstra Tween 80 (1 mL/L) (Fisher-BP338, USA) eklenir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan besiyerleri ve agar (devam)

MRS Broth	
Pepton	10.0
Et ekstraktı	8.0
Maya ekstraktı	4.0
D(+)-Glikoz	20.0
Dipotasyum hidrojen fosfat	2.0
Sodyum asetat trihidrat	5.0
Triamonyum sitrat	2.0
Magnezyum sülfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2
Manganez sülfat tetrahidrat ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0.05

*Ekstra Tween 80 (1 mL/L) (Fisher-BP338, USA) eklenir.

M17 Broth	
Soya peptonu	5.0
Et peptonu	2.5
Kazein peptonu	2.5
Et ekstraktı	5.0
Maya ekstraktı	2.5
Laktoz monohidrat	5.0
Askorbik asit	0.5
Sodyum β -gliserofosfat	19.0
Magnezyum sülfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.25

KEA Agar	
Kazein peptonu	20.0
Maya ekstraktı	5.0
Sodyum klorür (NaCl)	5.0
Sodyum sitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	1.0
Sodyum azid (NaN_3)	0.15
Kanamisin sülfat ($\text{C}_{18}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_{15}\text{S}$)	0.02
Eskulin ($\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_9$)	1.0
Amonyum demir(III) sitrat ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{FeNO}_7$)	0.5

Nutrient Broth	
Jelatinin enzimatik dijesti	5.0
Sığır eti ekstrakt	3.0

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan besiyerleri ve agar (devam)

Skim Milk Agar	g/L
Skim Milk tozu (Fluka-70166, Germany)	%10
Agar	15.0

Dekarboksilaz Aktivitesi Teşhis Ortamı	g/L
Tripton (Merck-1.07213.1000, Germany)	%0.5
Maya ekstrakt (Merck-1.03753, Germany)	%0.5
Sodyum klorür (NaCl) (Merck-1.06400, Germany)	%0.5
Glikoz (Merck-1.08342, Germany)	%0.1
Tween 80 (Fisher-BP338, USA)	%0.05
Magnezyum sülfat heptahidrat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (Merck-5882, Germany)	%0.02
Kalsiyum karbonat ($CaCO_3$) (Merck-1.02066, Germany)	%0.01
Bromokrezol mor (Merck-1.03025, Germany)	%0.006
Manganez sülfat tetrahidrat ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$) (Merck-1.02786, Germany)	%0.005
Demir sülfat heptahidrat ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) (Merck-1.03965, Germany)	%0.004
Agar	%2
Tirozin (Merck-1.08371, Germany)	%2
Fenilalanin (Merck-1.07256, Germany)	%2
Arjinin (Merck-1.01542, Germany)	%2
Triptofan (Merck-1.08374, Germany)	%2

%2 Sodyum Sitrat Çözeltisi	
Tri Sodyum Sitrat Dihidrat (Merck 1.06448, Germany)	20.0

Manyetik ısıtıcıda çözdürülür ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanır.

%0.1 Pepton Tuz Çözeltisi (Peptone Salt Solution)	
Bakteriyolojik pepton (OXOID-LP0037, USA)	1.0
Sodyum klorür (NaCl) (Merck-1.06400, Germany)	9.0

Manyetik ısıtıcıda çözdürülür ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanır.

1X Fosfat Tamponlu Salin (PBS)	
Sodyum klorür (NaCl) (Merck-1.06400, Germany)	8.0
Potasyum klorür (KCl) (Merck-1.04936, Germany)	0.2
Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) (Merck-1.06586, Germany)	1.44
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (Merck-1.04873, Germany)	0.24

Manyetik ısıtıcıda çözdürülür ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanır. pH ayarlamak için (Naoh ve HCl ile) 800 mL distile suyla hazırlanıp, üstü 1 L'ye tamamlanır.

%60'lık Gliserol	
Gliserol (Fisher-BP229-1, USA)	60.0
Distile su	40.0

Manyetik ısıtıcıda çözdürülür ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanır.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan besiyerleri ve agar (devam)

%1 Agaroj jel	
1X TAE (Tris-asetat-EDTA) tampon	100.0 mL
Agaroj (Sigma-A5093, Germany)	1 g

Liziz Tamponu (Genomik DNA izolasyonu için)	
20 mM Tris-HCl, pH 8.0 (Sigma-T-5941, Germany)	
2 mM EDTA (Merck-1.08418.1000, Germany)	
%1.2 Triton X-100 (Merck-1.08603.1000, Germany)	
Lizozim (20 mg/mL) (Sigma-L6876, Germany)	
Nükleaz içermeyen su (Bioshop-7732-18-5, Canada)	

Agarlı besiyerleri, uygun bir erlene, uygun miktarda besiyeri eklenmiş ve 1000 mL distile su ilavesi ile tamamlanmıştır ve otoklavda sterilize edilmiştir (121°C, 15dk). Sterilizasyondan sonra steril petrilere, serolojik pipet yardımıyla 20 mL olacak şekilde dökülmüştür ve katılaşması beklenmiştir. Agarsız besiyerleri (broth) cam tüplere 5'er mL şeklinde konularak hazırlanmış ve otoklavda sterilize edilmiştir. Katı besiyerleri, broth ortamlarına 15g/1000mL olacak şekilde agar eklemesi ile elde edilmiştir.

Skim milk agar hazırlanırken, uygun bir erlene, belirtilen miktarda Skim Milk tozu eklenerek 1000 mL distile su ilavesi ile tamamlanmıştır ve 121°C'de 5 dakika süre (karamelizasyona uğramaması için) ile otoklavda sterilize edilmiştir. Sterilizasyondan sonra steril petrilere, serolojik pipet yardımıyla 20 mL olacak şekilde dökülmüştür ve katılaşması beklenmiştir. Broth Skim Milk de aynı yöntemle agar eklenmeden hazırlanmıştır.

Dekarboksilaz aktivitesi teşhis ortamı hazırlanırken, uygun bir erlene, belirtilen miktarlarda kimyasallar eklenmiş ve 1000 mL distile su ilavesi ile tamamlanmıştır ve bu ortam 121°C'de 10 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir. Sterilizasyondan sonra steril petrilere, serolojik pipet yardımıyla 20 mL olacak şekilde dökülmüş ve katılaşması beklenmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Peynir örneklerinin toplanması

Peynir örnekleri, steril koşullarda toplanarak, 20'şer gram olacak şekilde aseptik numune kaplarına alınmıştır. Köpük strafor kutuya, buz aküleri yerleştirilmiş ve aralarına peynir örneklerinin bulunduğu numune kapları konulmuştur. Bu koşullar altında, en kısa zamanda laboratuvara getirilerek analize alınmaya başlanmıştır. Analizler, Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Prokaryotik Genetik laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.2.2 Bakterilerin izolasyonu

Peynir örnekleri, bir havan aracılığıyla ezilmiş ve homojenizasyonun yapılması için, Sonics marka (Vibra Cell VCX 130, USA) ultrasonik homojenizatör kullanılmıştır. 8 adet uygun erlene, 180 mL'şer % 2 sodyum sitrat çözeltisi (özellikle peynirlerin homojenizasyonu amacıyla kullanılan bir seyreltme çözeltisidir) eklenmiş ve her erlene farklı peynir örneği (20 gr) konularak homojenizatör yardımıyla homojenize olana kadar belirli aralıklarla frekans verilmiştir. Homojenizasyon boyunca işlem görmeyen erlenlerin üstü kontaminasyona maruz kalmaması amacıyla parafilm ile kapatılmıştır.

Steril petriler, farklı peynir örnekleri için dilüsyon sayısına bağlı olarak, 3 paralel olacak şekilde etiketlenmiştir. Cam şişedeki, 90 mL'şer 8 adet pepton tuz çözeltilerinin (tuzda büyüme eğilimine sahip bakterileri seçmek için kullanılan bir çözeltilidir) üstüne, 10'ar mL daha önceden homojenizasyonu yapılmış, % 2 sodyum sitrat çözeltisi içindeki farklı peynir örnekleri, serolojik pipet yardımıyla eklenmiş ve 100 mL'ye tamamlanmıştır. Steril tüplere 900 µL PBS konularak, 100 µL pepton tuz çözeltisi ve sodyum sitrat çözeltisi ile birleştirilen peynir örnekleri, 10^{-6} seyreltmeye kadar seri dilüsyon yapılmıştır. Her seyreltme derecesi 3 paralel olarak MRS, M17 ve KEA besiyerlerine, steril drigalski spatülü yardımıyla, yayma ekim yöntemiyle ekilmiş ve 48 saat inkübasyona (MRS ve KEA 37°C'de, M17 30°C'de) bırakılmıştır.

48 saat inkübasyondan sonra sayılabilecek kadar üreyen bakterilerin olduğu petriler arasından, olabildiğince çeşitli morfolojide kolonilerden, laktik asit bakterisi olma potansiyeli olan bakteriler seçilmiştir. Seçilen kolonilerin gözle görülebilen morfolojik özellikleri (büyüklüğü, yapısı, şekli) not edilmiştir. Bu bakteriler, öze yardımıyla tek koloni alınarak, 5'er mL'lik tüplerdeki MRS, M17 ve Nutrient (37°C'de) (KEA yerine) sıvı besiyerlerine ekilmiş ve uygun sıcaklıklardaki statik inkübatörlere, inkübasyon için bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonucunda yeterince üreme gerçekleştiren bakteriler, uygun katı besiyerlerine (NB'deki KEA'ya), çizgi ekim metoduyla ekilmiştir ve tekrar uygun sıcaklıklardaki inkübatörlere, 24 saat süreyle inkübe edilmiştir.

Çizgi ekim sonrası, tek koloni üreyen bakteriler, biyokimyasal testler için muhafaza edilmeleri amacıyla sıvı besiyerlerinden alınarak, %40'luk stoklarda (334 µL sıvı besiyerindeki bakteri + 666 µL gliserol), -20°C'de saklanmıştır (Strobel 2009).

3.2.3 Bakterilerin antimikrobiyal aktivite spektrumlarının belirlenmesi

Potansiyel probiyotik suşların, patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek amacıyla kuyu difüzyon testi yapılmıştır.

LAB potansiyeli olan bakteriler ve indikatör olarak kullanılacak patojen bakteriler, bir gün öncesinden, üremelerine uygun sıvı besiyerlerine pasajlanarak, uygun sıcaklıkta, 18 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Aynı zamanda, patojen bakterilerin üremesine uygun katı besiyerleri (LB ve TSB) de hazırlanmış ve steril petrilere dökülmüştür. Deneyin yapılacağı gün, patojenlerin üremesine uygun yarı katı (soft) besiyerleri (%0,5 agar) (LB ve TSB) 5'er mL'lik tüplerde hazırlanmıştır.

Pasajlanan izolatların aktif kültürlerinden 1'er mL alınarak, 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine konulmuştur. Bu bakteriler, 6000 rpm'de, 15 dakika, oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra, tüplerdeki süpernatantlar (üst sıvı), mikropipetle çekilerek 0.22 µM por çaplı membran filtrelerden (GVS Acrylic Blue membr.-7089972, USA) geçirilmiş ve yeni steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.

Yarı katı besiyerleri katılaştırmadan, içlerine 100'er µL olacak şekilde, her birine farklı, pasajlanmış patojenlerden eklenmiş ve homojenize edilmiştir. Homojenize edilen tüplerdeki yarı katı besiyerleri, bir gün öncesinden hazırlanmış agar plakalara, hızlıca dökülmüş ve petrinin her yerine eşit gelecek şekilde yayılmıştır. İndikatörleri içeren yarı katı besiyerleri katılaştıktan sonra, agar delici (corkborer) yardımıyla, her petriye 4 adet 5 mm'lik kuyucuklar açılmıştır. Kuyucukların içine 1 tanesi negatif kontrol olacak şekilde, 3 kuyucuğa 100'er µL'şer filtrat inoküle edilmiştir. Petriler ters çevrilmeden 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda, probiyotik suşların test edilen patojen bakterilere karşı oluşturdukları inhibisyon zonları incelenmiş ve zon oluşturan izolatlar, inhibitör aktiviteye sahip suşlar olarak değerlendirilmiştir (Balouiri vd. 2016, Bayram ve Yıldırım 2016, Bhunia vd. 1991, Biswas vd. 1991).

3.2.4 Gram boyama

Kuyu difüzyon metoduna pozitif sonuç veren izolatların, morfolojik özelliklerini mikroskop altında tespit etmek için gram boyama yapılmıştır. Gram boyama işlemi için Merck boyama seti (1.11885.0001, Germany) kullanılmıştır.

3.2.5 Asidifikasyon aktivitesi

Kuyu difüzyon metoduna pozitif sonuç veren izolatların, laktoz fermentasyonu sonucu asitlik artışına bağlı olarak pH'da meydana gelen değişiklikleri belirlemek amacıyla, asidifikasyon aktivitesi testi yapılmıştır.

Aktif kültür oluşturmak için, bir gün önceden MRS sıvı besiyerlerine ekilen izolatlar, 18 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. 50 mL'lik tüplere, 10'ar mL'lik Skim Milk sıvı besiyerleri 3 paralel olacak şekilde hazırlanmıştır. Skim Milk'lere, aktif kültürlerden (OD'leri 600 nm'de 0.05-0.2'ye göre ayarlanmış) %1 oranında aşılama yapılmış ve 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Negatif kontrol olarak aktif kültür konulmamış, boş besiyeri kullanılmış ve deneyler 3 tekrar şeklinde yapılmıştır.

İnkübasyonun 0, 3, 6, 9, 24. saatlerinde, tüplerden 2 mL örnek alınmış ve steril tüplere konularak, aseptik koşullarda pH ölçümleri not edilmiştir. Başlangıç ve bitiş pH değerleri dikkate alınarak Δ pH değerleri hesaplanmıştır (Akoğlu vd. 2016, Durlu-Özkaya vd. 1999).

3.2.6 Proteolitik aktivite

Çalışmada kullanılacak suşları aktive etmek için, bir gün önceden MRS sıvı besiyerlerine ekilen izolatlar, 18 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Bakteri izolatlarının proteolitik aktivitesini belirlemek amacıyla Skim Milk agar hazırlanmıştır. Steril petrilere dökülen agarın katılaşması beklenmiştir. Petriler hayali dört eş parçaya ayrılmış ve 1'i kontrol olmak üzere 3 noktaya, mikropipet yardımıyla, aktif kültürlerden 10 µL'şer damlatılmıştır. Petriler, 37°C'de 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra oluşan zonlar, proteolitik aktivitenin oluşumunun göstergesi olarak değerlendirilmiştir (Harrigan 1998).

3.2.7 Dekarboksilaz aktivitesi

Aktif kültür elde etmek amacıyla bir gün önceden MRS sıvı besiyerlerine ekilen izolatlar, 18 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Bakteri izolatlarının dekarboksilaz aktivitesini belirlemek amacıyla, belirli aminoasitleri içeren bir teşhis ortamı hazırlanmış ve steril petrilere dökülmüştür. Petriler hayali dört eş parçaya ayrılmış ve 1'i kontrol olmak üzere 3 noktaya, mikropipet yardımıyla, aktif kültürlerden 10 µL'şer damlatılmıştır. Petriler, 37 °C'de 7 gün boyunca anaerobik inkübasyona (Biomérieux, GENBox anaer, France) bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra oluşan zonlar, dekarboksilaz aktivitesinin oluşumunun göstergesi olarak değerlendirilmiştir (Joosten ve Northolt 1989).

3.2.8 İzolatların farklı çevresel koşullara karşı dirençliliklerinin belirlenmesi

İzolatların, probiyotik özelliklerinin belirlenmesinde ilk olarak, düşük pH'a karşı direnç araştırılmıştır. Bu amaçla MRS agar ortamı hazırlanmış ve 18 saatlik aktif kültürlerden

1'er mL alınarak, OD'leri 600 nm'de 0.5 McFarland'a göre ayarlanmıştır. OD'si ayarlanmış kültürlerden 1'er mL alınmış ve 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine transfer edilerek, 12000 rpm'de, 5 dakika, +4°C'de çöktürülmüştür. Süpernatant atılmış ve peletler, PBS (pH 7.2) ile yıkanmıştır. Tekrar santrifüj yapılmış, süpernatant atılmış ve peletler, PBS (pH 7.2) ile yıkanmıştır. Son olarak santrifüj gerçekleştirilerek süpernatant ortamdaki uzaklaştırılmış ve peletlerin üzerine, her bir izolat için ayrı, pH'ı 1.0, 2.0, 3.0 ve 7.4'e (kontrol) ayarlanmış olan PBS'ler ilave edilmiştir. Bu ortamlar 37°C'de 3 saat süreyle bekletilmiştir. Bu zaman diliminde 0., 1, 2. ve 3. saatlerde test örnekleri alınmış ve PBS (pH 7.2) ile 10⁻⁶'ya kadar seyreltme yapılmıştır. Son dilüsyon ürünü, MRS agara 3 paralel şeklinde yayma ekim metoduyla ekilmiş ve 37 °C sıcaklıktaki inkübatöre konulmuştur. 48 saat inkübasyondan sonra canlı hücre sayımları gerçekleştirilmiş ve % hayatta kalma oranları log(kob/mL) cinsinden hesaplanmıştır. Deneyler 3 paralel, 3 tekrar şeklinde yapılmıştır ve % canlılık aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Maragkoudakis vd. 2006) ;

$$\% \text{ Canlılık} = \left(\frac{X}{X_0} \right) \times 100$$

X₀: Pozitif kontroldeki canlı hücre sayısı

X: Denemeye tabi tutulan bakterilerdeki canlı hücre sayısı

İzolatların, pepsine karşı dirençlerinin belirlenmesinde, gastrointestinal sistem koşullarının oluşturulabilmesi için, 3 mg/mL pepsin (Sigma-P7000, Germany) içeren, pH'ı 2.0 ve 3.0'e ayarlanmış PBS kullanılmıştır. Bu amaçla MRS agar hazırlanmış ve 18 saatlik aktif kültürlerden 1'er mL alınarak, OD'leri 600 nm'de 0.5 McFarland'a göre ayarlanmıştır. OD'si ayarlanmış kültürlerden 1'er mL alınmış ve 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine transfer edilerek, 12000 rpm'de, 5 dakika, +4 °C'de çöktürülmüştür. Süpernatant atılmış ve peletler, PBS (pH 7.4) ile yıkanmıştır. Tekrar santrifüj yapılmış, süpernatant atılmış ve peletler, PBS (pH 7.4) ile yıkanmıştır. Son olarak santrifüj işlemi gerçekleştirilmiş ve oluşan süpernatant ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Peletlerin üzerine, her bir izolat için ayrı, pH'ı 2.0, 3.0 ve 7.4'e (kontrol) ayarlanmış olan PBS'ler ilave edilmiş ve 37°C'de 3 saat bekletilmiştir. Sonra bekleme süresinin 0., 1. ve 3. saatlerinde kontrol ve test gruplarından örnek alınarak, PBS (pH 7.2) ile 10⁻⁶'ya kadar

seyreltme yapılmıştır. Son dilüsyon ürünü, MRS agara 3 paralel şeklinde yayma ekim metoduyla ekilmiş ve 37 °C sıcaklıktaki inkübatöre konulmuştur. 48 saat inkübasyondan sonra canlı hücre sayımları gerçekleştirilmiş ve % hayatta kalma oranları log(kob/mL) cinsinden hesaplanmıştır (Maragkoudakis vd. 2006).

İzolatların, pankreatine karşı dirençlerinin belirlenmesinde, 1 mg/mL pankreatin (Merck-P7545, Germany) içeren, pH'ı 8.0'a ayarlanmış PBS kullanılmıştır. Bu amaçla MRS agar hazırlanmış ve 18 saatlik aktif kültürlerden 1'er mL alınarak, OD'leri 600 nm'de 0.5 McFarland'a göre ayarlanmıştır. OD'si ayarlanmış kültürlerden 1'er mL alınmış ve 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine transfer edilerek, 12000 rpm'de, 5 dakika, +4°C'de çöktürülmüştür. Süpernatant atılmış ve peletler, PBS (pH 7.4) ile yıkanmıştır. Tekrar santrifüj yapılmış, süpernatant atılmış ve peletler, PBS (pH 7.4) ile yıkanmıştır. Tekrar santrifüj işlemine tabi tutulan bu ortamlardan süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, peletlerin üzerine her bir izolat için pH'ı 8.0 ve 7.4'e (kontrol) ayarlanmış olan PBS'ler ilave edilmiş ve 37°C'de 4 saat bekletilmiştir. Sonra bekleme süresinin 0. ve 4. saatlerinde kontrol ve test gruplarından örnek alınarak, PBS (pH 7.2) ile 10⁻⁶'ya kadar seyreltme yapılmıştır. Son dilüsyon ürünü, MRS agara 3 paralel şeklinde yayma ekim metoduyla ekilmiş ve 37°C sıcaklıktaki inkübatöre konulmuştur. 48 saat inkübasyondan sonra canlı hücre sayımları gerçekleştirilmiş ve % hayatta kalma oranları log(kob/mL) cinsinden hesaplanmıştır (Maragkoudakis vd. 2006).

İzolatların, safra tuzuna karşı toleranslarının belirlenmesinde, farklı oranlarda safra tuzu (Fluka-48305, Germany) içeren MRS sıvı besiyerleri kullanılmıştır. Bu amaçla, %0.3, %0.5 ve %1 konsantrasyonlarında safra tuzu bulunduran, besiyerleri hazırlanmıştır. 18 saatlik aktif kültürlerden 1'er mL alınarak, OD'leri 600 nm'de 0.5 McFarland'a göre ayarlanmıştır. OD'si ayarlanmış kültürlerden 1'er mL alınmış ve 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine transfer edilerek, 12000 rpm'de, 5 dakika, +4°C'de çöktürülmüştür. Süpernatant atılmış ve peletler, PBS (pH 7.4) ile yıkanmıştır. Tekrar santrifüj yapılmış, süpernatant atılmış ve peletler, PBS (pH 7.4) ile yıkanmıştır. Son santrifüj işlemi uygulanarak süpernatant atılmış ve peletler, her bir izolat için ayrı, %0.3, %0.5, %1 ve %0 (kontrol) konsantrasyonlarında safra tuzu bulunduran MRS besiyerlerinde çözdürülmüştür. Bu ortamlar 37°C'de 4 saat süreyle bekletilmiştir.

İnkübasyonun 0. ve 4. saatlerinde tüm deneme deseni numunelerinden örnekler alınarak, PBS (pH 7.2) ile 10^{-6} 'ya kadar seyreltme yapılmıştır. Son dilüsyon ürünü, MRS agara 3 paralel şeklinde yayma ekim metoduyla ekilmiş ve 37°C sıcaklıktaki inkübatöre konulmuştur. 48 saat inkübasyondan sonra canlı hücre sayımları gerçekleştirilmiş ve % hayatta kalma oranları $\log(\text{kob/mL})$ cinsinden hesaplanmıştır (Maragkoudakis vd. 2006).

3.2.9 Otoagregasyon

İzolatların kendi aralarında bir araya gelerek kümeler oluşturma sürecini ve birbirlerine tutunma derecelerini yani otoagregasyonu belirlemek amacıyla Vandevor ve ark. (1992) tarafından önerilen metot kullanılmış ve deneyler 3 tekrar şeklinde yapılmıştır.

Bu amaçla, iki ardışık pasaj işlemi uygulanarak aktive edilmiş 18 saatlik kültürler, 1'er mL ve 3 paralel olacak şekilde mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır. Tüpler, 10000 rpm'de, 15 dakika, 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj uygulamasından sonra, üst sıvı atılmış ve peletler 1x, 7.2 pH'lı PBS ile yıkanmıştır. Tüpler tekrar 10000 rpm'de, 15 dakika, 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Üst sıvı atılmış ve peletler, 1x, 7.2 pH'lı PBS ile yıkanmıştır. Yıkama sonrasında elde edilen örnekler, 15 mL'lik tüplere transfer edilmiştir. Üzerlerine 9 mL, 1x, 7.2 pH'lı PBS eklenmiş ve yavaşça karıştırılmıştır. 0. Saat OD'leri (600 nm), spektrofotometrede ölçülmüş ve not edilmiştir. Daha sonra 37°C'de, 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon boyunca 4, 20 ve 24. saatlerde, tüplerin üst kısımlarından, karıştırılmadan, 1'er mL örnekler alınarak, absorbanları ölçülmüş ve not edilmiştir. Bu değerler ile otoagregasyon (OA olarak ifade edilmek üzere) formülü kullanılarak, agregasyon yüzdesi hesaplanmıştır (Vandevor ve ark. 1992).

$$\%OA = \left[\frac{(OD_1 - OD_2)}{OD_1} \right] \times 100$$

OD₁: İlk optikal dansite

OD₂: 4/20/24 saat sonraki optikal dansite

3.2.10 Koagregasyon

İzolatların, patojen bakterilerle etkileşime girerek kümeler oluşturma sürecini yani koagregasyonu belirlemek amacıyla Handley ve ark. (1987) tarafından geliştirilen metot kullanılmış ve deneyler 3 tekrar şeklinde yapılmıştır.

Bu amaçla, 18 saatlik aktif deney suşları ve patojen bakteri kültürleri, 1'er mL, 3 paralel olacak şekilde mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır. Tüpler, 10000 rpm'de, 15 dakika, 4°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra, üst sıvı atılmış ve peletler 1x, 7.2 pH'lı PBS ile yıkanmıştır. Tüpler tekrar 10000 rpm'de, 15 dakika, 4°C'de santrifüj edilmiştir. Üst sıvı atılmış ve peletler, 1x, 7.2 pH'lı PBS ile yıkanmıştır. Yıkama sonrasında elde edilen örneklerin, 0. Saat OD'leri (600 nm), spektrofotometrede ölçülmüş ve 0.05-0.2 absorbans değerleri arasına ayarlanmıştır. Eşit miktarlardaki, absorbansı ayarlanmış izolatlar ve patojenler, aynı tüpte yavaşça karıştırılmıştır ve tekrar OD'leri ölçülüp not edilmiştir. Daha sonra 37°C'de, 20 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon boyunca 4 ve 20. saatlerde, tüplerin üst kısımlarından, karıştırılmadan, 1'er mL örnekler alınarak, absorbansları ölçülmüş ve not edilmiştir. Bu değerler ile koagregasyon (KA olarak ifade edilmek üzere) formülü kullanılarak, agregasyon yüzdesi hesaplanmıştır (Handley vd. 1987).

$$\%KA = \left[\frac{(OD_{pat} + OD_{izolat}) - OD_{mix}}{OD_{pat} + OD_{izolat}} \right] \times 100$$

OD_{pat}: Patojenlerin, 0. Saat optikal dansitesi

OD_{probio}: İzolatların, 0. Saat optikal dansitesi

OD_{mix}: Karışımın, 4/20 saat sonraki optikal dansite

3.2.11 İzolatların Caco-2 hücrelerine tutunması

Agregasyon denemeleri sonucu, en verimli aktivite gösteren iki izolat için, Caco-2 hücrelerine tutunma testi gerçekleştirilmiştir. Caco-2 hücreleri, insan ince bağırsak epitel hücrelerine benzer özellikler gösterirler. Bu sebeple, izolatların, bu hücrelere ne derecede tutunduğunu belirlemek amacıyla, Caco-2 (insan kolon epidermal adenokarsinom hücre hattı) hücrelerine tutunma testi yapılmıştır. Deneyler 3 tekrar şeklinde yapılmıştır (Jankowska vd. 2008).

Ön hazırlık olarak Caco-2 hücreleri, %10'luk fetal sığır serumu (FBS) ve antibiyotik ilaveli, Dulbecco Modifiye Eagle besiyerinde (DMEM) (GIBCO, USA), 37°C'de, % 5 CO₂ anaerobik şartlarında geliştirilmiştir. Geliştirilen hücreler, 24 kuyuya sahip hücre kültür plakalarına ekilmiş ve iki günde bir yenilenerek pasajlanmıştır.

İzolatların 18 saatlik aktif kültürleri, 8000 g'de, 5 dakika boyunca çöktürülmüştür ve iki kere PBS ile yıkama yapılmıştır. Hücre kültürlerinin konsantrasyonları, DMEM ile 2×10^7 kob/mL'ye ayarlanmış ve 1,5 µL hacimli mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır. Tüplerdeki hücreler, içlerinde Caco-2 hücre hattı bulunan kuyucukların üzerine 130 µL olacak şekilde ilave edilmiştir. Denemeler 3 paralel olacak şekilde hazırlanmıştır. Kültür plakları, 37°C'de, % 5 CO₂ anaerobik şartlarında, 90 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Belirtilen sürenin sonunda, tutunmamış bakteri hücrelerini ortamdan uzaklaştırmak için, bakteri süspansiyonu steril bir pipet kullanılarak alınmış ve kuyulardaki Caco-2 hücreleri iki kez PBS tamponu ile yıkanmıştır. Caco-2 hücrelerine tutunmuş bakterileri kuyulardan almak için, hücrelere, 250 µL tripsin-EDTA, 37 °C'de 10 dakika boyunca uygulanmıştır. Daha sonra, tripsin reaksiyonunu durdurmak amacıyla, 250 µL FBS içeren besiyeri eklenmiştir. Kuyulardan alınan bakteriler, steril tüplere alınmış ve PBS ile 10^{-6} 'ya kadar seyreltme yapılmıştır. Dilüsyonlar, 3 paralel olacak şekilde, MRS agara yayma ekim gerçekleştirilmiş ve 37°C'de, 18 saat bekletilmiştir. Bu işlem bitiminde, canlı hücre sayımları gerçekleştirilmiş ve % hayatta kalma oranları log(kob/mL) cinsinden 3.2.8'deki gibi hesaplanmıştır. Kontrol olarak, Caco-2 hücrelerini içermeyen izolatlar kullanılmıştır (Maragkoudakis vd. 2006).

3.2.12 16S rDNA dizi analizi ile izolatların tanımlanması

İzolatların tanımlaması, bu metotla yapılmıştır. Metota göre; genomik DNA'nın izolasyonu yapıp, PZR'la çoğaltılmıştır. Baz dizi sıraları, Sanger analiziyle belirlenmiş ve dizilerin FASTA formatları kullanılarak, NCBI veri tabanında bulunan diğer mikroorganizmalarla karşılaştırılıp, tanımlanmaları yapılmıştır.

3.2.12.1 Genomik DNA izolasyonu ve saflaştırılması

Genomik DNA izolasyonu ve saflaştırılması, Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Kit Numarası: K0722, USA) yardımıyla yapılmıştır. Gram pozitif bakterilerin hücre duvarını kırmak daha zor olduğu için, kitte de belirtildiği gibi, öncesinde bir liziz tamponu hazırlanmıştır. Liziz tamponu için gerekli olan malzemeler metot kısmında belirtilmiştir. 50 mL son hacme ayarlanan liziz tamponunu kullanmadan hemen önce lizozim eklenmiştir.

18 saatlik aktif kültürler, 2 mL'lik steril mikrosantrifüj tüplerine, 2 mL olacak şekilde alınmıştır. Tüpler, 5000 g'de, 10 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüjden sonra, tüplerdeki üst sıvılar uzaklaştırılmıştır. Kullanıma hazır, lizozim eklenmiş, liziz tamponundan 180 µL'şer alınarak her pelete konulmuş ve süspanse (pipetleme yoluyla) edilmiştir. Süspanse edilen örnekler, 37 °C'de, 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, her örneğe 200 µL Liziz çözeltisi ve 20 µL Proteinaz K eklenmiştir. Düzgün bir süspansiyon elde etmek için örnekler, nazikçe karıştırılmıştır. Homojen hale gelen örnekler, 56 °C'de, 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon esnasında, hücreler tamamen parçalanana kadar, ara sıra karıştırılmıştır. İnkübasyondan sonra ise, her örneğe 20 µL RNase A çözeltisi eklenmiş ve karıştırılmıştır. Elde edilen karışım, oda sıcaklığında, 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra her örneğe, 200 µL Liziz çözeltisi eklenmiş ve homojen bir karışım elde edilinceye kadar yaklaşık 15 saniye boyunca elle karıştırılmıştır. 400 µL, % 50 konsantrasyona sahip etanol de eklendikten sonra, tüm örnekler yine, homojenliğinden emin olunana kadar pipet yardımı ile karıştırılmıştır. Hazırlanan her bir tüp, ayrı ayrı, kitten çıkan saflaştırma kolonlarına transfer edilmiştir ve altlarına yine kitten çıkan toplama tüpleri yerleştirilmiştir. Bu

kolonlar, 6000 g'de, 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Toplama tüpleri atılmış ve yerine, steril toplama tüpleri konulmuştur. Saflaştırma kolonlarının üzerine, 500 µL yıkama tamponu I eklenmiş ve 8000 g'de 1 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası, toplama tüpleri atılmış ve tekrar, steril toplama tüpleri konulmuştur. Saflaştırma kolonlarının üzerinden bu sefer, 500 µL yıkama tamponu II eklenmiş ve 12000 g'de, 3 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Toplama tüpleri atılmış ve örneklerin içinde bulunduğu saflaştırma kolonları, 1.5 mL'lik steril mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır. Genomik DNA'yı ayırtmak için, saflaştırma kolonlarının merkezine, 200 µL Elüsyon tamponu eklenmiş ve oda sıcaklığında 2 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra tüpler, son kez, 8000 g'de 1 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve saflaştırma kolonları atılarak, mikrosantrifüj tüplerinin kapakları kapatılmıştır. Genomik DNA örneklerinin, NanoDrop yardımıyla saflıkları ölçülmüş ve polimeraz zincir reaksiyonunda (PZR) kullanılması amacıyla, -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.12.2 16S rDNA bölgesinin PZR ile çoğaltılması

Peynirlerden izolasyonu gerçekleştirilen bakterilerin, genomik DNA'larındaki 16S rDNA bölgelerini çoğaltmak amacıyla, Beasley ve Saris'(2004) dizayn edilen, 16S ileri (5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3') ve 16S geri (3'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-5') primerleri kullanılmıştır. Örneklerin genomik DNA'ları, thermal cyclers (Technique 512, England) aracılığıyla, yukarıda verilen primerler kullanılarak çoğaltılmıştır. Bu amaçla, 500 µL'lik PZR tüplerine, son hacim 25 µL olacak şekilde sırasıyla; 12.5 µL ExpressGO™ PreMix-CE 2X PCR Master Mix (BioOptic, Taiwan), 10.5 µL moleküler steril su (nükleaz içermeyen) 0.5 µL 16S ileri primeri, 0.5 µL 16S geri primeri ve 1 µL kalıp DNA eklenmiş ve mikropipet yardımıyla iyice karıştırılmıştır. Hazırlanan tüpler, PZR cihazına yerleştirilmiş ve PZR dereceleri ve adımları, Çizelge 3.2'deki gibi ayarlanarak PZR işlemi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2 16S PZR adımları

PZR adımları	Sıcaklık	Zaman
Denatürasyon (çift zincirin açılması)	94°C	45 sn
Bağlanma (primerlerin bağlanması)	46°C	60 sn
Uzama (zincir uzaması)	72°C	60 sn

*Toplam 30 çevrimlik

3.2.12.3 Agaroz jel elektroforezi

16S PZR sonucu elde edilen ürünlerin, moleküler büyüklüklerini belirlemek amacıyla, agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Bu amaçla %1 oranında agaroz içeren 100 mL'lik, 1X, Tris-Asetat-EDTA (TAE) tamponu hazırlanmıştır. Hazırlanan tamponun içerisindeki agarozun çözünmesi için, 2 dakika boyunca mikrodalga fırın kullanılarak, tampon homojenize edilmiştir. 45 °C'ye kadar soğutulan tampon, her yere eşit gelecek şekilde plakaya dökülmüş ve uygun tarak yerleştirilip, agarozun polimerizasyonu beklenmiştir. Elektroforez tankına, yüzeyi kaplayacak kadar TAE eklenmiştir. Plakaya dökülen agaroz jelin polimerizasyonu tamamlandıktan sonra, tarak çıkarılmıştır. PZR'ı yapılan örnekler, yükleme boyası (loading dye) (Fermentas, R0611, USA) eklenmiş ve agaroz jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Markör olarak, GeneRuler 1 kb (1000 bp) DNA Ladder (Fermentas, SM0311, USA) kullanılmıştır. Elektroforez işlemi, 100 V'da, 50 dakika boyunca gerçekleşmiştir. Süre bitiminde, agaroz jel tanktan alınmış ve 30 dakika EtBr içinde, sonrasında da 15 dakika boyunca distile su içinde bekletilmiştir. Sonra UV ışın altında fotoğrafları çekilmiş ve kaydedilmiştir. PZR ürünleri, tanımlanmaları amacıyla dizi analizine gönderilmiştir

3.2.12.4 Sanger DNA dizi analizi

İzolatların 16S rDNA bölgeleri PZR ile çoğaltıldıktan sonra, analizi yapılmak üzere AgriGenomics Hub (Ankara, Türkiye) firmasına, hizmet alımı yapılarak, sonuçlar elde edilmiştir. Daha sonra dizilerin, MEGA11 programı kullanılarak, FASTA formatları elde edilmiştir. NCBI veri tabanı üzerinde bulunan diğer mikroorganizmalarla karşılaştırılmış ve tanımlanmaları yapılmıştır.

3.2.13 İstatistiki analizler

İstatistiksel analizlerde, R paket programı kullanılmıştır. Koloni sayımı içermeyen yanıt değişkenleri için tekrarlayan gözlemlili ANOVA modelleri kurulmuştur ve gruplar arası farklılıklar varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. Tekrarlayan gözlemlili ANOVA modeli kullanılmasının amacı, zamana bağılı birey içi değişkenliğin dikkate alınmasıdır. Sayım içeren yanıt değişkenleri için, Poisson regresyonu yapılmıştır. Gruplar arası farklılıklar, sapma analizi ile incelenmiştir.



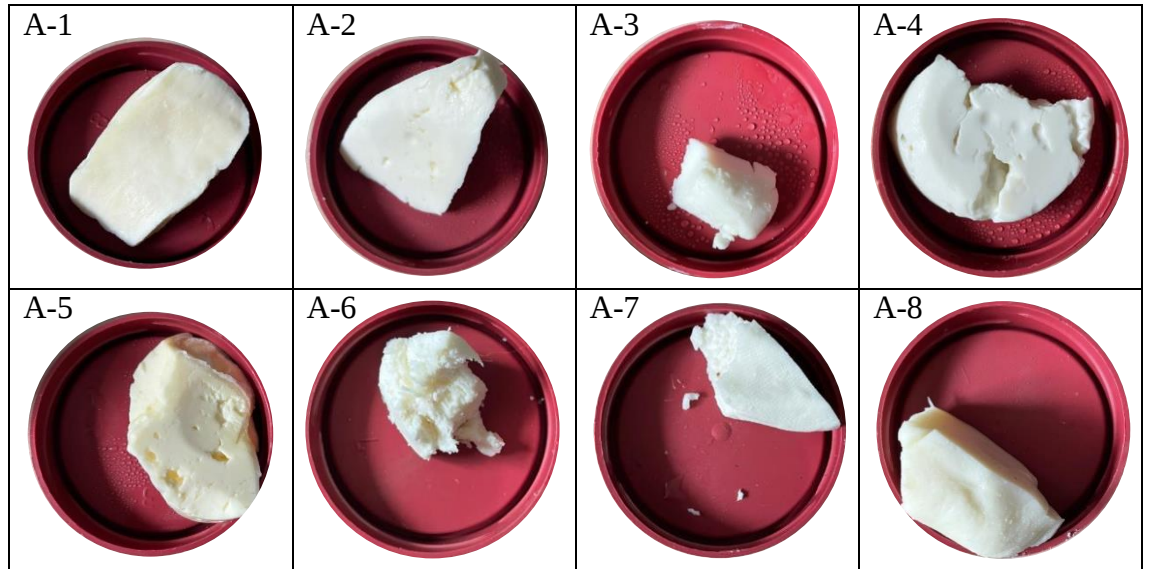
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Peynir Örneklerinin Yapısal Özellikleri

Çalışmada kullanılan gıda ürünleri, Türkiye'nin 3 farklı şehrinden toplanmış, 8 adet, geleneksel yollarla üretilmiş olan peynirlerdir. Bu kapsamda kullanılan peynirler, toplandığı yerler ve yapısal özellikleri Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Peynirlerin toplandıkları yerler ve yapısal özellikleri

Peynir kodları	Toplandığı yer	Yapısı
A-1	Birecik/Şanlıurfa	Yumuşak
A-2	Gaziantep	Yumuşak
A-3	Nizip/Gaziantep	Yumuşak
A-4	Birecik/Şanlıurfa	Yumuşak
A-5	Nizip/Gaziantep	Yumuşak
A-6	Nizip/Gaziantep	Sert
A-7	Siverek/Şanlıurfa	Yarı sert
A-8	Mardin	Yumuşak



Şekil 4.1 Çalışmada kullanılan peynir türleri

4.2 İzolatların Antimikrobiyal Aktivite Özellikleri

İzolatların, bazı patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite spektrumlarının belirlenmesi amacıyla yapılan kuyu difüzyon zon sonuçları Çizelge 4.2’de verilmiştir. Zon vermeyen izolatlar elenerek çizelgeye ve diğer çalışmalara dahil edilmemiştir.

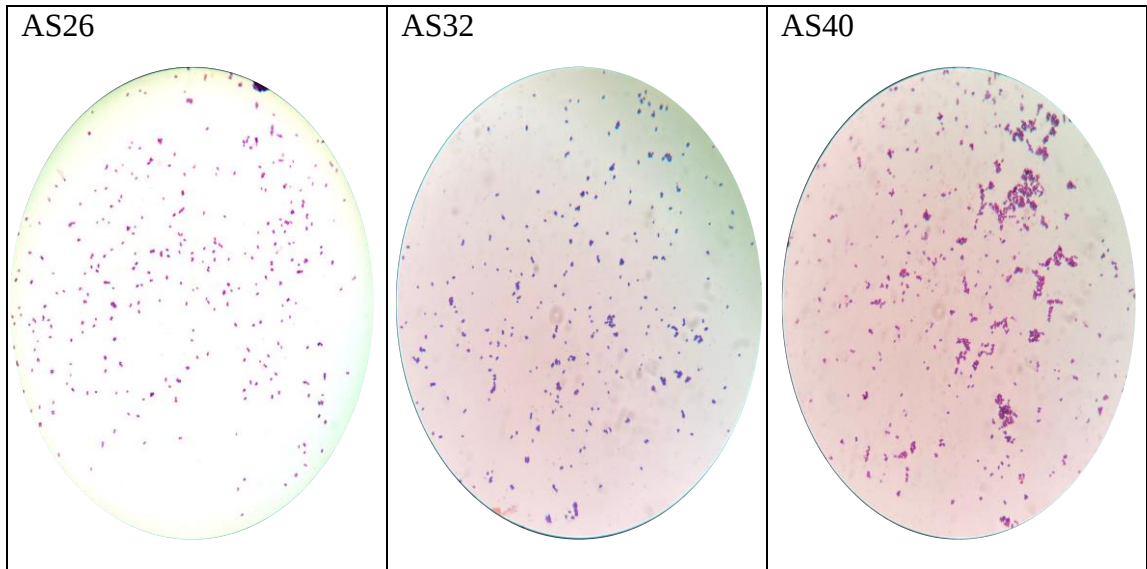
Çizelge 4.2 İzolatların patojenlere karşı etkinlik gösterdiği kuyu difüzyon zon sonuçları

İndikatör bakteriler	İzolat kodu	Zon çapı (mm)
<i>Salmonella</i> Typhimurium 14028	AS53	13,6
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	AS57	11,6
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	AS66	11,3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	AS53	10
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	AS40	10,6
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	AS26	12,3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	AS32	11,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AS26	12,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AS57	11,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AS66	10,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AS53	9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AS32	11,3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AS40	10,6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AS57	13
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AS26	12,6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AS53	12,3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AS32	11,6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AS66	11,3
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	AS40	10
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	AS32	10,3
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	AS57	11
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	AS26	11,3
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	AS53	11,3
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	AS53	8
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	AS26	10,6
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	AS32	8
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11776	AS57	12,3
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11776	AS26	8,5

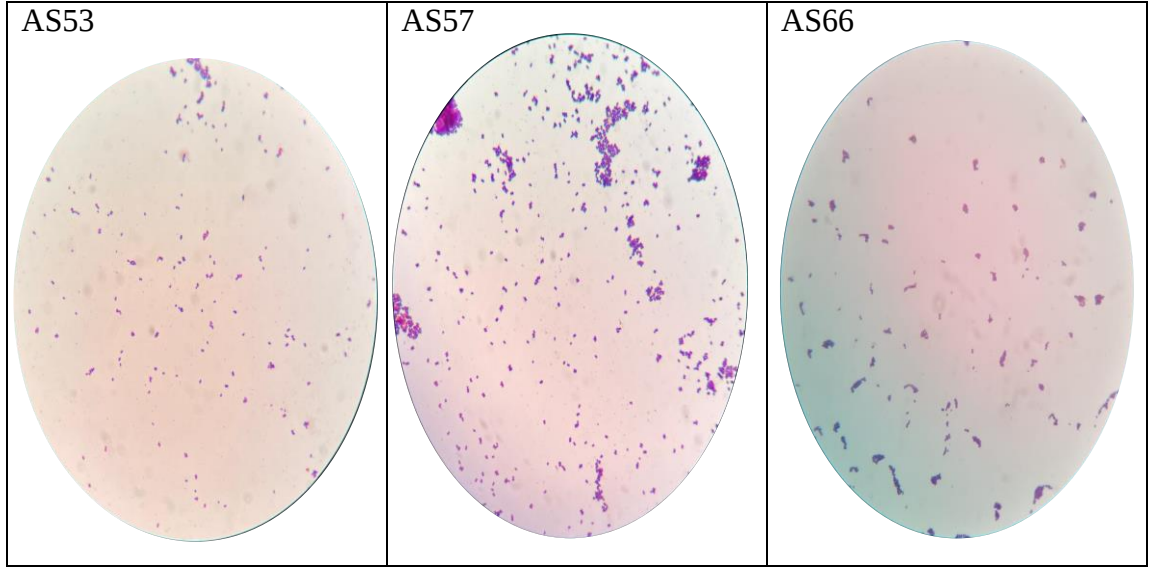
Kuyu difüzyon denemesi yapılan 6 farklı izolatın her birinin, en az bir indikatör patojene karşı antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir. Kullanılan yedi patojene karşı inhibitör etkisi olan tek suşun, AS26 olduğu tespit edilmiştir. AS53 suşunun, *Bacillus cereus* ATCC 11776 hariç diğer altı patojene karşı, AS57 suşunun, *Salmonella* Typhimurium 14028 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 hariç beş patojene karşı, AS32 suşunun, *Salmonella* Typhimurium 14028 ve *Bacillus cereus* ATCC 11776 hariç beş patojene karşı aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Diğer yandan; AS40 suşunun sadece, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ve *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 patojenlerine karşı ve AS66 suşunun da *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa* patojenlerine karşı etkinlik gösterdiği saptanmıştır.

4.3 Gram Boyama

Kuyu difüzyon yapılp, antimikrobiyal aktivite gösteren izolatların gram boyama sonuçlarının görüntüleri Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.2 Gram boyama görüntüleri

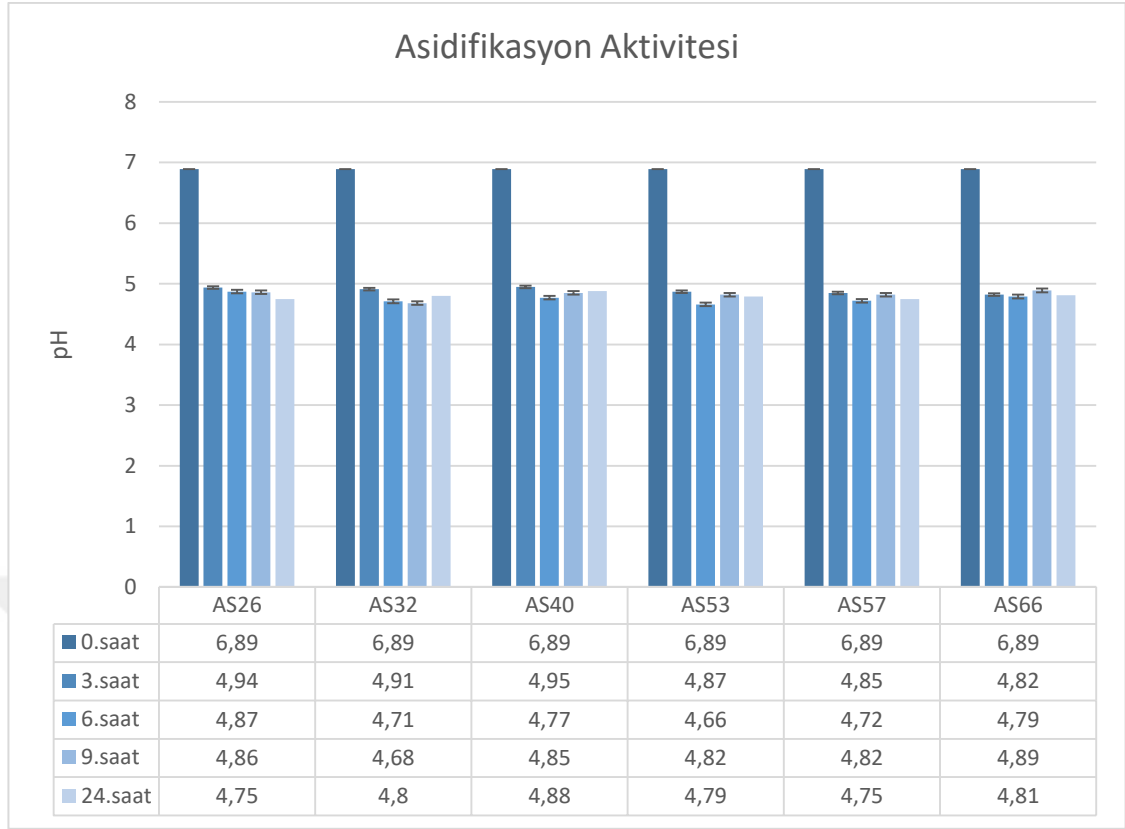


Şekil 4.2 Gram boyama görüntüleri (devam)

Gram boyama sonucu, 6 izolatın hepsi, Gram pozitif olarak belirlenmiştir.

4.4 Asidifikasyon Aktivitesi

İzolatların, 3, 6, 9 ve 24. saatlerdeki fermantasyon sonucunda oluşturdukları asit üretme, buna bağlı olarak pH değişimleri Şekil 4.3’de ve Δ pH değerleri de Çizelge 4.3’de verilmiştir. Nihai değerler, birbiriyle ilişkisiz üç paralelin ortalaması alınarak elde edilmiştir.



Şekil 4.3 İzolatların asidifikasyon aktivitesi

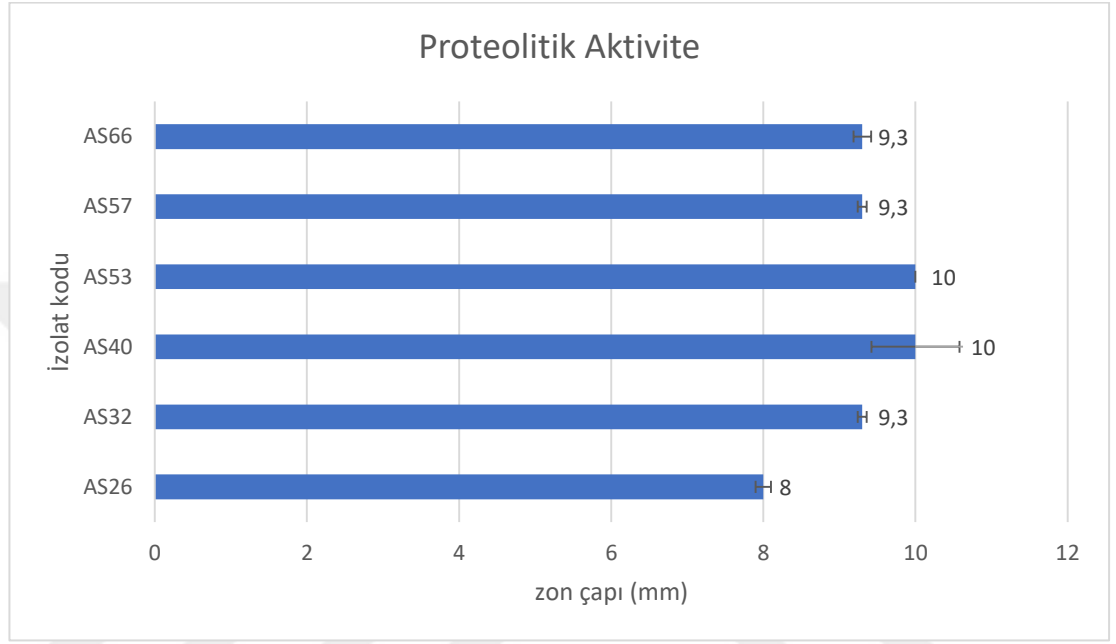
Çizelge 4.3 İzolatların asidifikasyon aktivitesi Δ pH değerleri

İzolat kodu	Δ pH (6s)	Δ pH (24s)
AS26	2,02	2,14
AS32	2,18	2,09
AS40	2,12	2,01
AS53	2,23	2,1
AS57	2,17	2,14
AS66	2,1	2,08

Asitlik derecesini (pH'ı), 6 saatlik sürenin bitiminde en fazla düşüren izolatlar; AS53, AS32 ve AS57 olarak tespit edilmiştir. Öte yandan, pH'ı, 24 saatlik sürenin bitiminde en çok azaltan izolatların ise AS26 ve AS57 olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, izolatların hepsinin, 24 saat sonunda Δ pH değerlerinin 2'nin üzerine çıktığı saptanmıştır (Şekil 4.3 ve Çizelge 4.3).

4.5 Proteolitik Aktivite

İzolatların, proteolitik aktivitelerini belirlemek için yapılan deneyde, 7 gün sonunda oluşan zonların çapları Şekil 4.4’de verilmiştir.

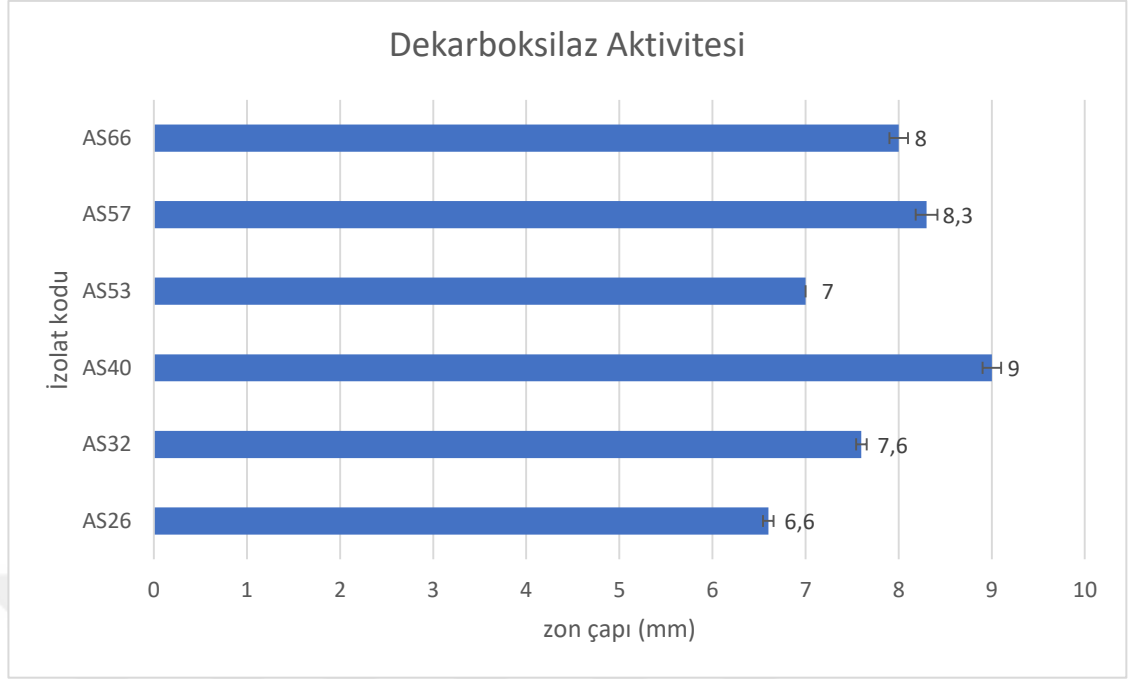


Şekil 4.4 Proteolitik aktivite ölçümleri

7 günlük inkübasyon sonunda, izolatların tamamının farklı çaplarda zon oluşturarak, yüksek düzeyde proteolitik aktivite içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.4).

4.6 Dekarboksilaz Aktivitesi

İzolatların, proteolitik aktivitelerini belirlemek için yapılan deneyde, 7 gün sonunda oluşan zonları çapları Şekil 4.5’de verilmiştir.

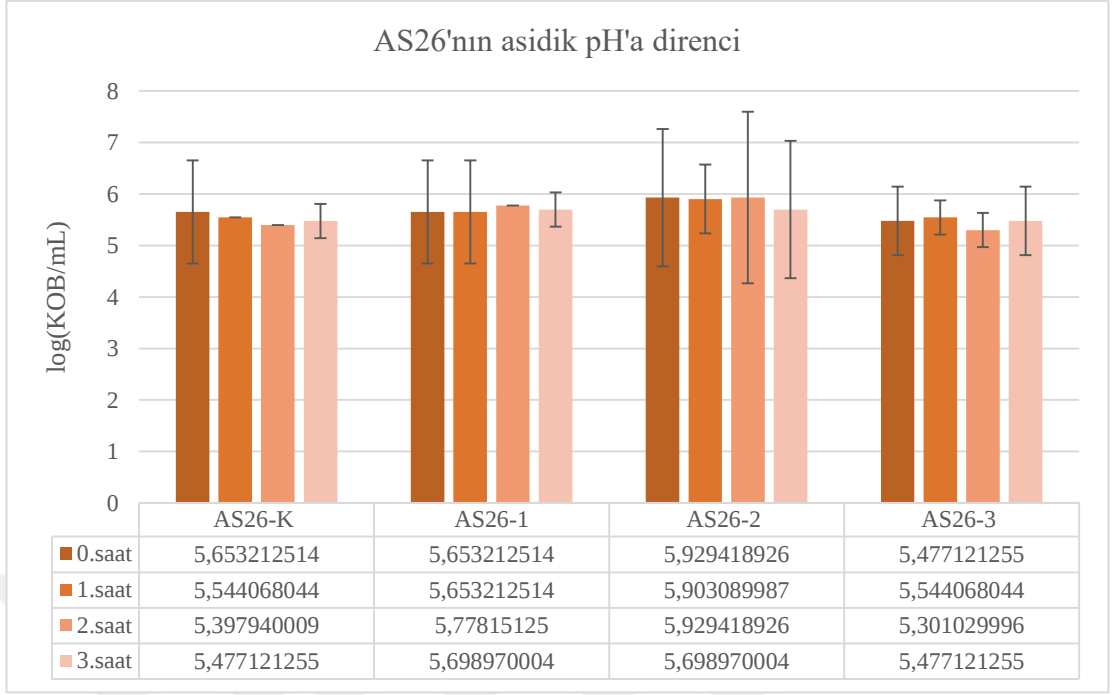


Şekil 4.5 İzolatların dekarboksilaz aktivitesi zon sonuçları

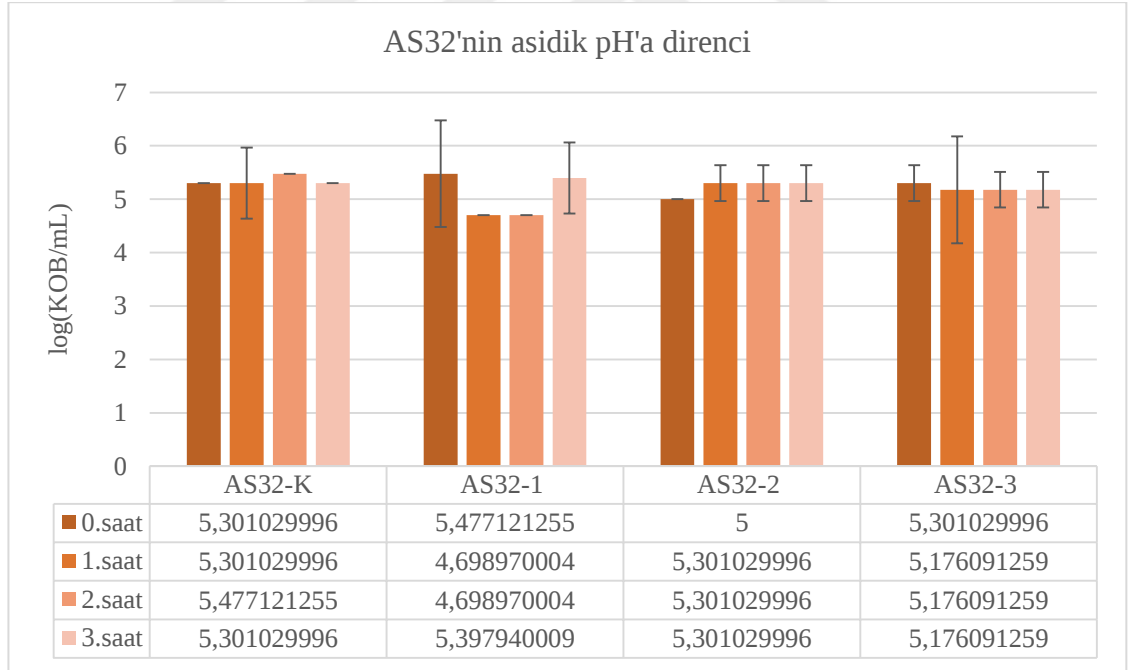
7 günlük inkübasyon sonunda, izolatların tamamının zon oluşturarak, dekarboksilaz aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir.

4.7 İzolatların in vitro Koşullarda Gösterdiği Probiyotik Potansiyel

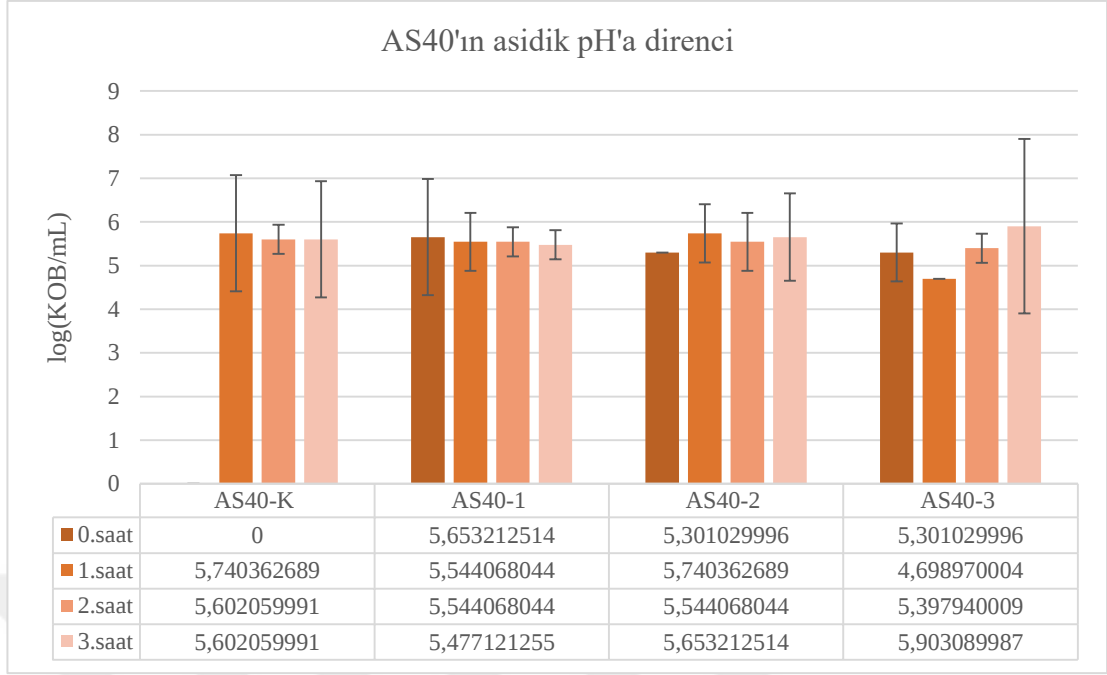
Çalışmamızda izolatların probiyotik potansiyellerinin belirlenmesinde kullanılan ilk kriter, onların mide asidine direncinin yani düşük pH'a direncinin belirlenmesi olmuştur. Bu analizlere ilişkin sonuçlar Şekil 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11'de verilmiştir. Analiz sonucu ortaya çıkan %canlılık sonuçları da EK-2'de verilmiştir.



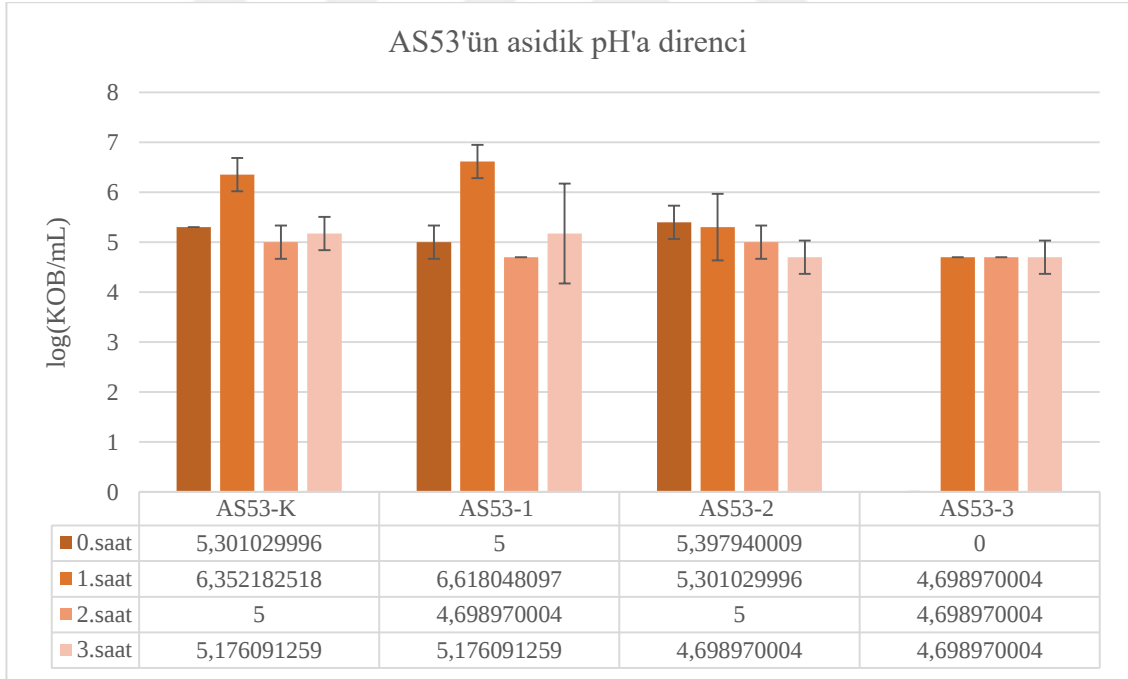
Şekil 4.6 AS26'nin düşük pH'a direnci (K: Kontrol= 7.4 pH, 1: 1.0 pH, 2: 2.0 pH, 3: 3.0 pH)



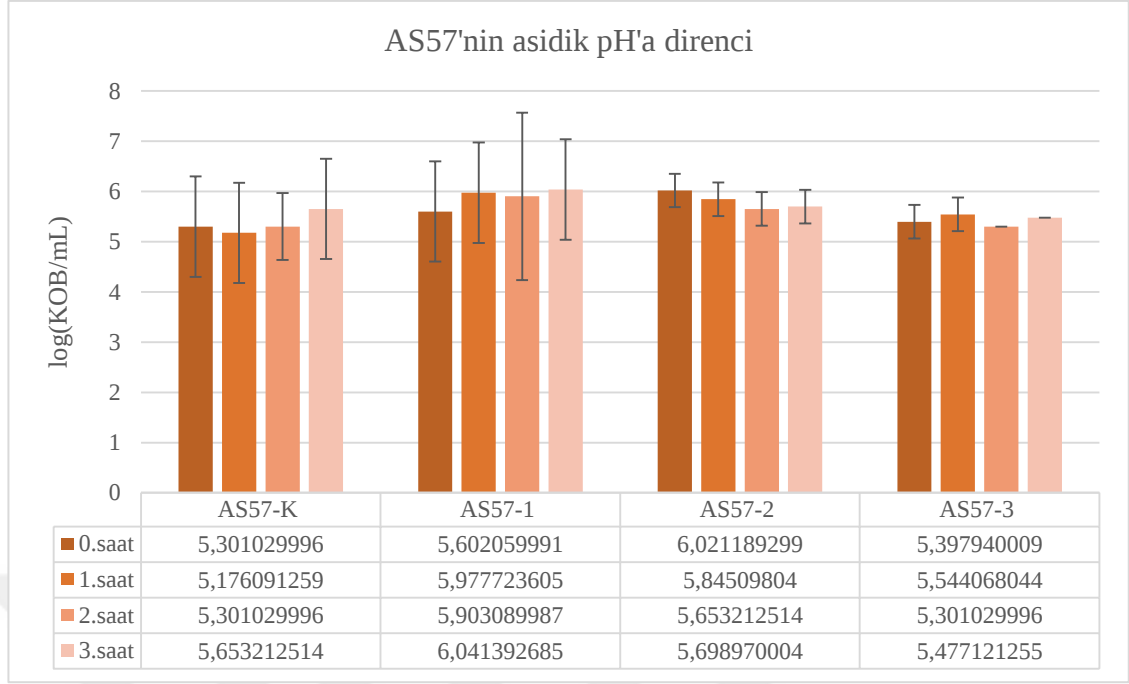
Şekil 4.7 AS32'nin düşük pH'a direnci (K: Kontrol= 7.4 pH, 1: 1.0 pH, 2: 2.0 pH, 3: 3.0 pH)



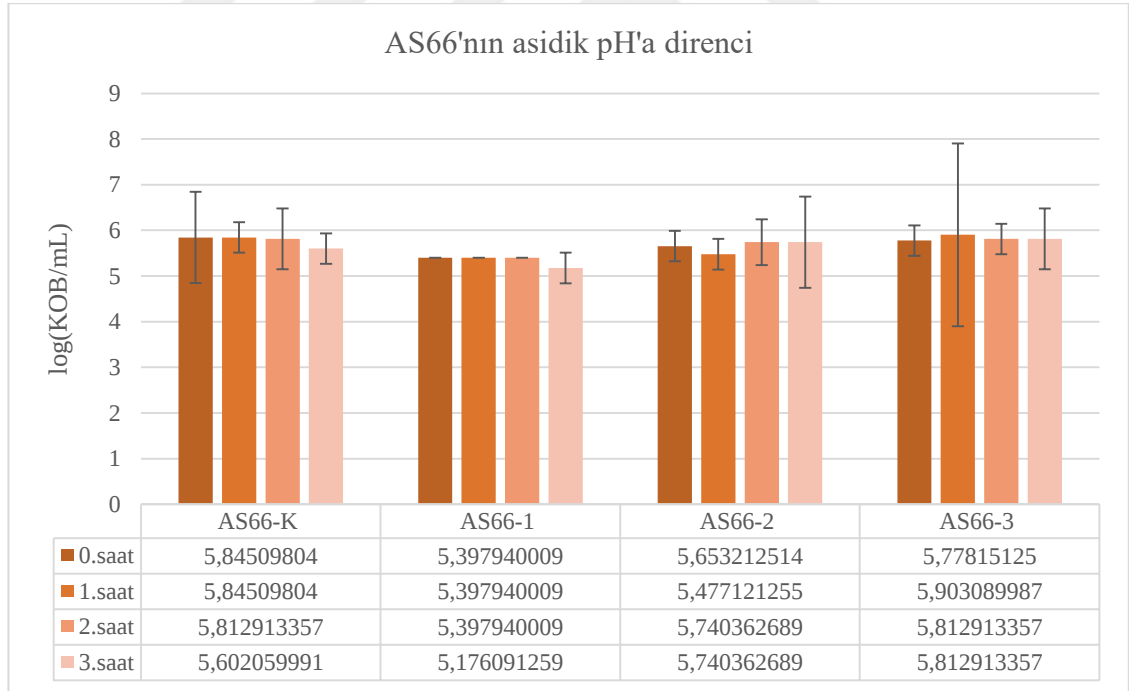
Şekil 4.8 AS40'ın düşük pH'a direnci (K: Kontrol= 7.4 pH, 1: 1.0 pH, 2: 2.0 pH, 3: 3.0 pH)



Şekil 4.9 AS53'ün düşük pH'a direnci (K: Kontrol= 7.4 pH, 1: 1.0 pH, 2: 2.0 pH, 3: 3.0 pH)



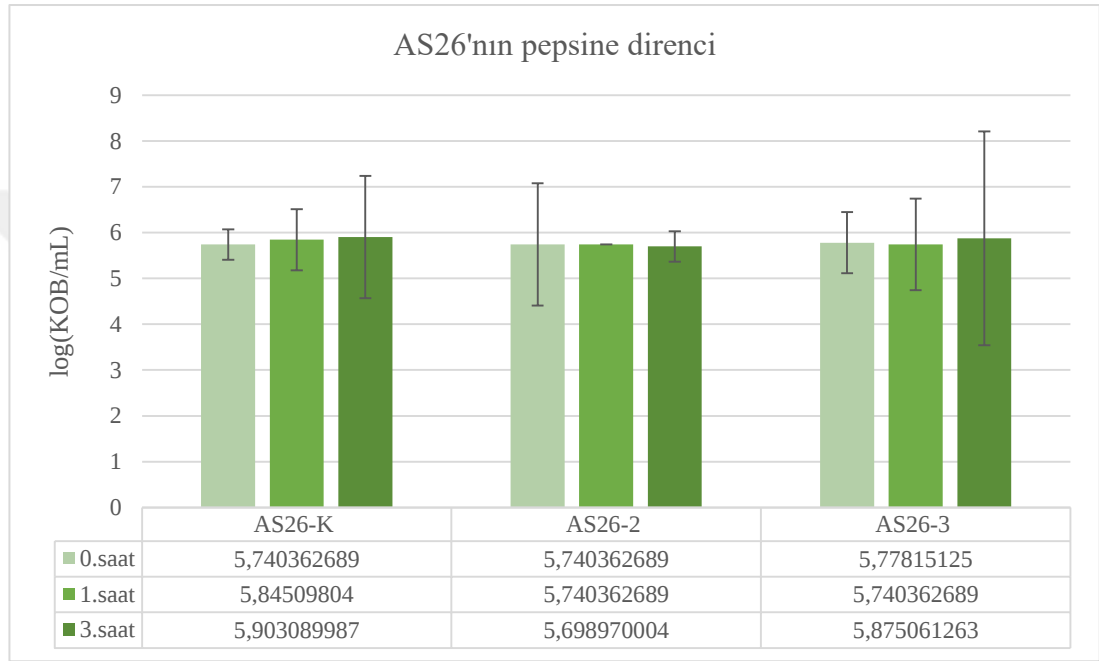
Şekil 4.10 AS57'nin düşük pH'a direnci (K: Kontrol= 7.4 pH, 1: 1.0 pH, 2: 2.0 pH, 3: 3.0 pH)



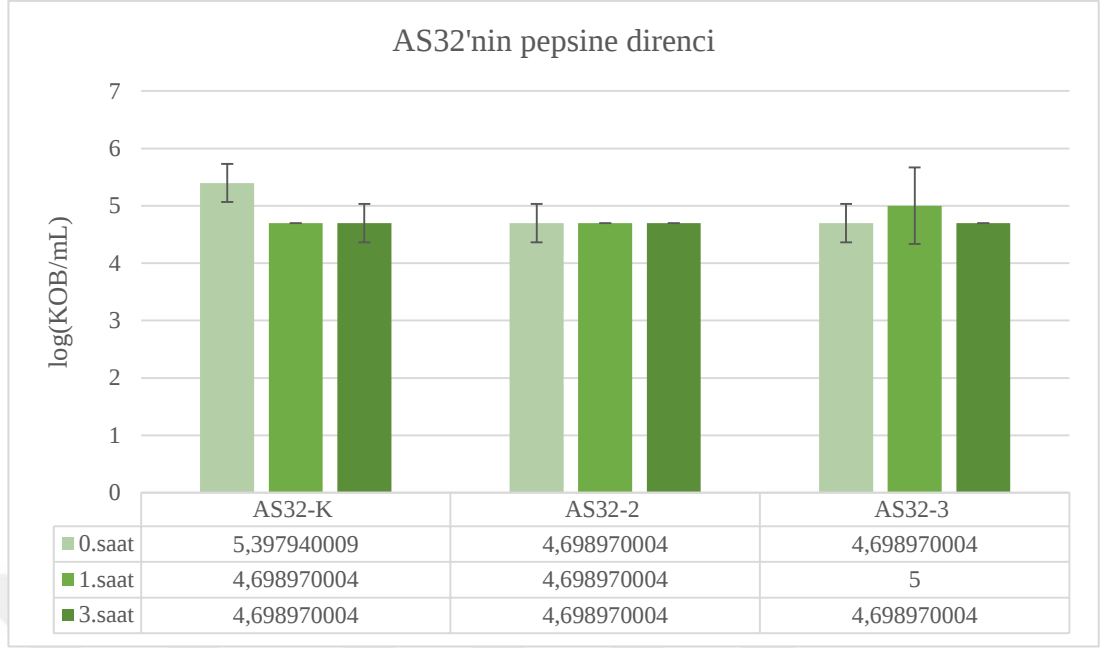
Şekil 4.11 AS66'nın düşük pH'a direnci (K: Kontrol= 7.4 pH, 1: 1.0 pH, 2: 2.0 pH, 3: 3.0 pH)

Bu sonuçlara göre, izolatların saatlere ve pH'lara göre canlılık oranları değişse de, tüm izolatların, 3 saat boyunca, pH 1.0, 2.0 ve 3.0'te canlılıklarını sürdürdükleri gözlemlenmiştir.

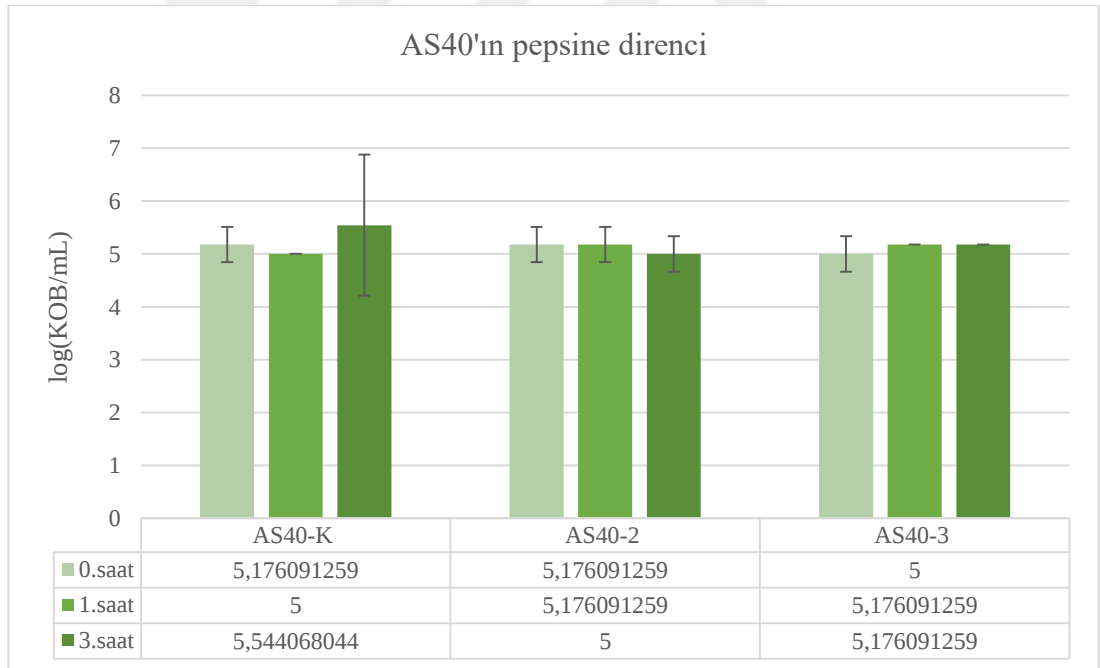
İzolatların, pepsine karşı dirençlilikleri Şekil 4.12, 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.17'de verilmiştir.



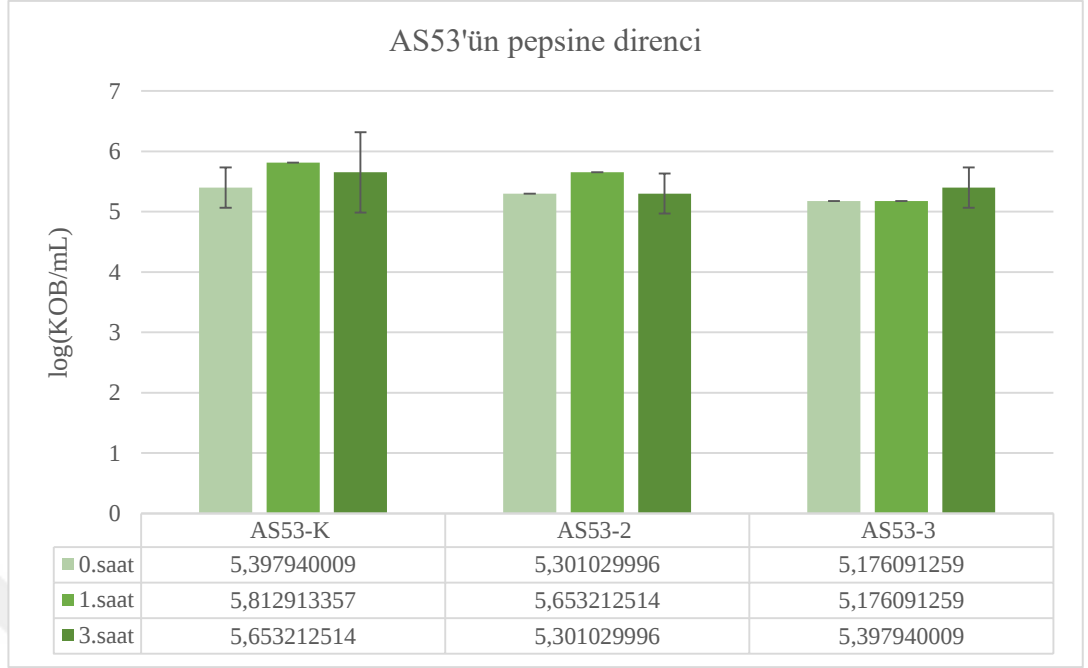
Şekil 4.12 AS26'nın pepsine direnci (K: Kontrol= 7.2 pH, 2: 2.0 pH, 3: 3.0 pH)



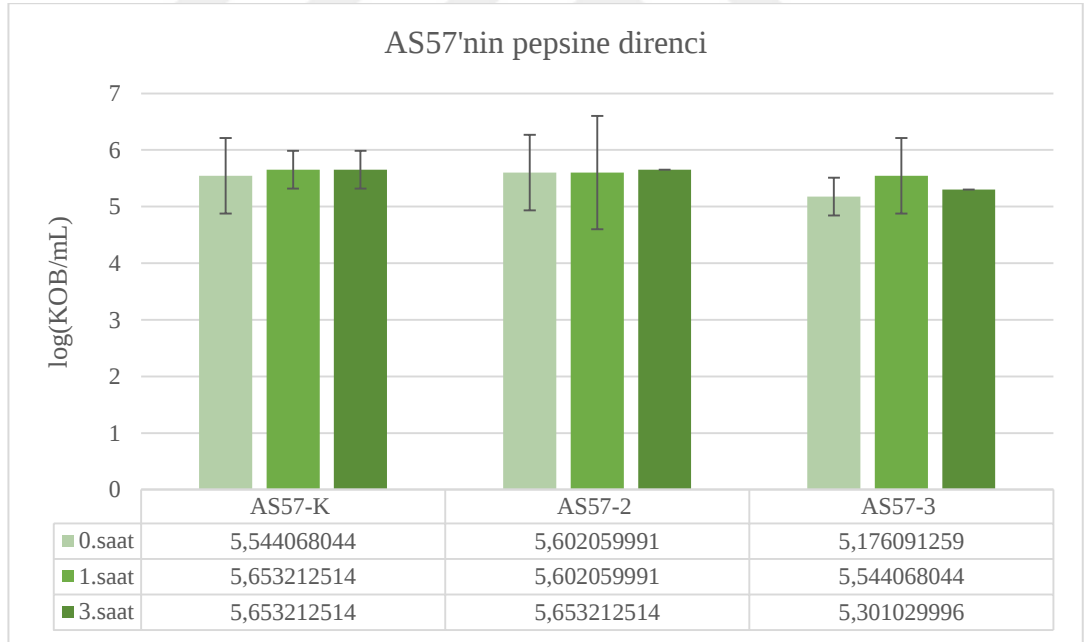
Şekil 4.13 AS32'nin pepsine direnci (K: Kontrol= 7.2 pH, 2: 2.0 pH, 3: 3.0 pH)



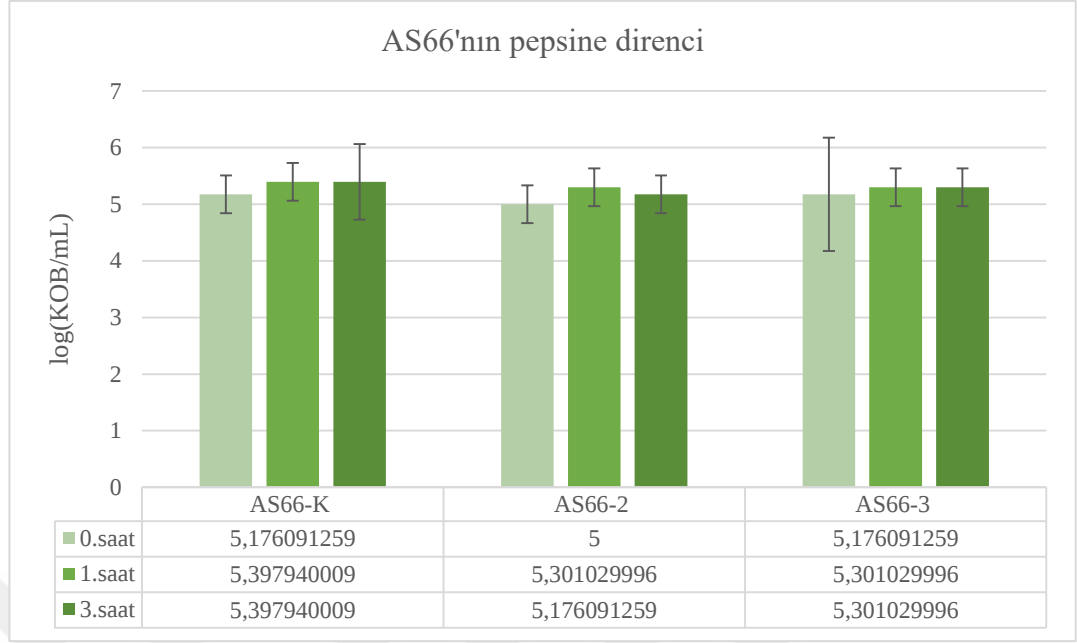
Şekil 4.14 AS40'ın pepsine direnci (K: Kontrol= 7.2 pH, 2: 2.0 pH, 3: 3.0 pH)



Şekil 4.15 AS53'ün pepsine direnci (K: Kontrol= 7.2 pH, 2: 2.0 pH, 3: 3.0 pH)



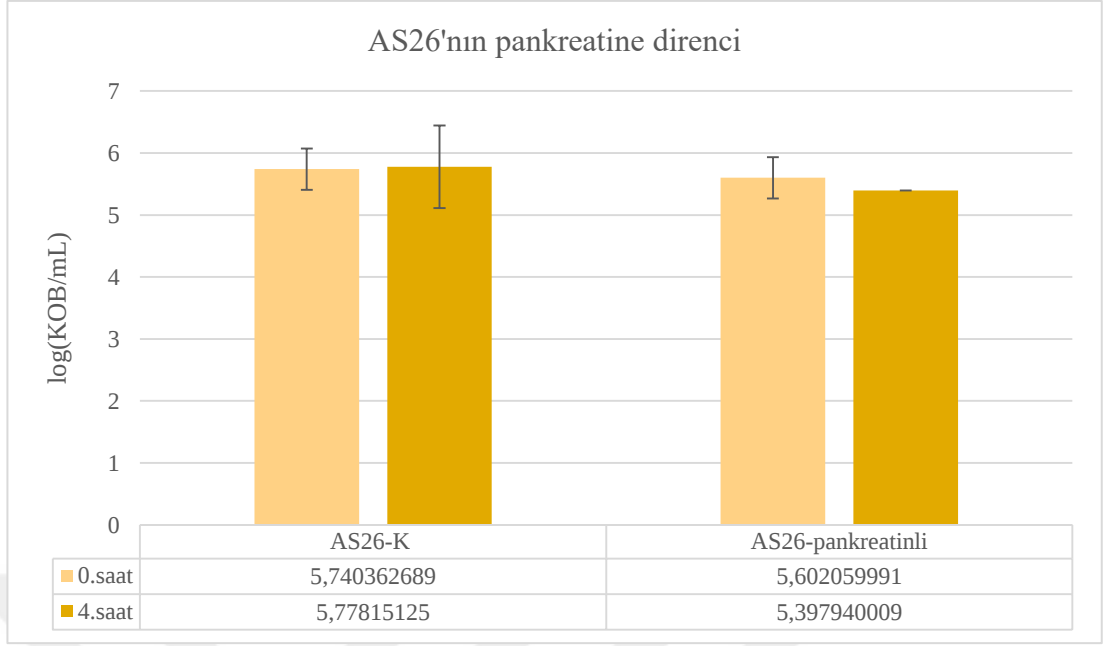
Şekil 4.16 AS57'nin pepsine direnci (K: Kontrol= 7.2 pH, 2: 2.0 pH, 3: 3.0 pH)



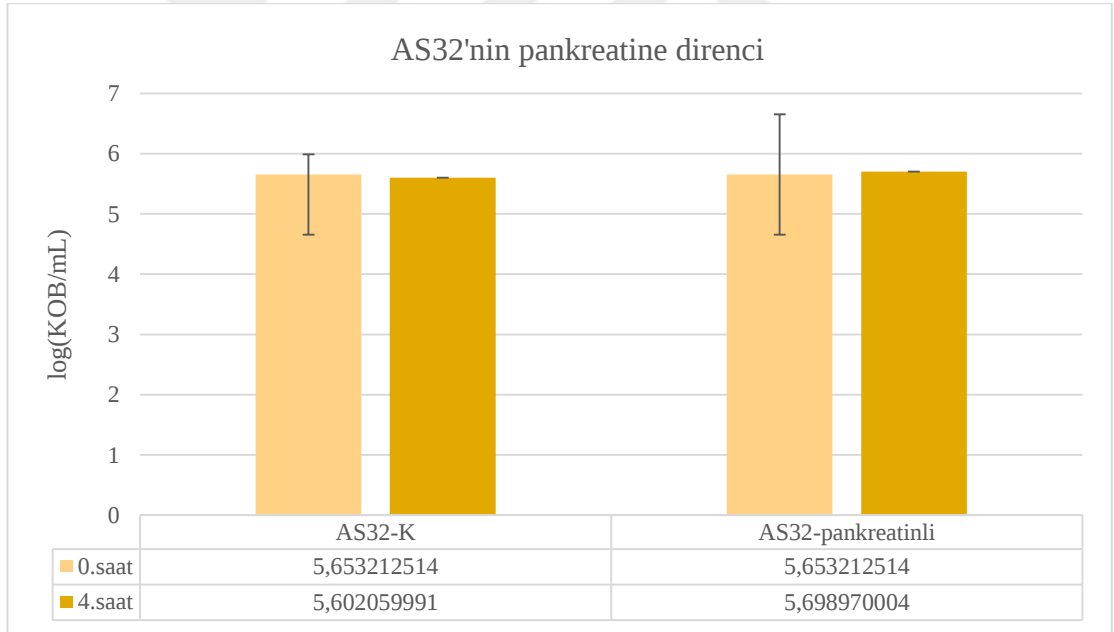
Şekil 4.17 AS66'nın pepsine direnci (K: Kontrol= 7.2 pH, 2: 2.0 pH, 3: 3.0 pH)

Bu sonuçlara göre, izolatların saatlere ve pH'lara göre pepsine karşı canlılık oranları değişse de, tüm izolatların, 3 saat boyunca, pH 2.0 ve 3.0'te canlılıklarını sürdürebildikleri tespit edilmiştir.

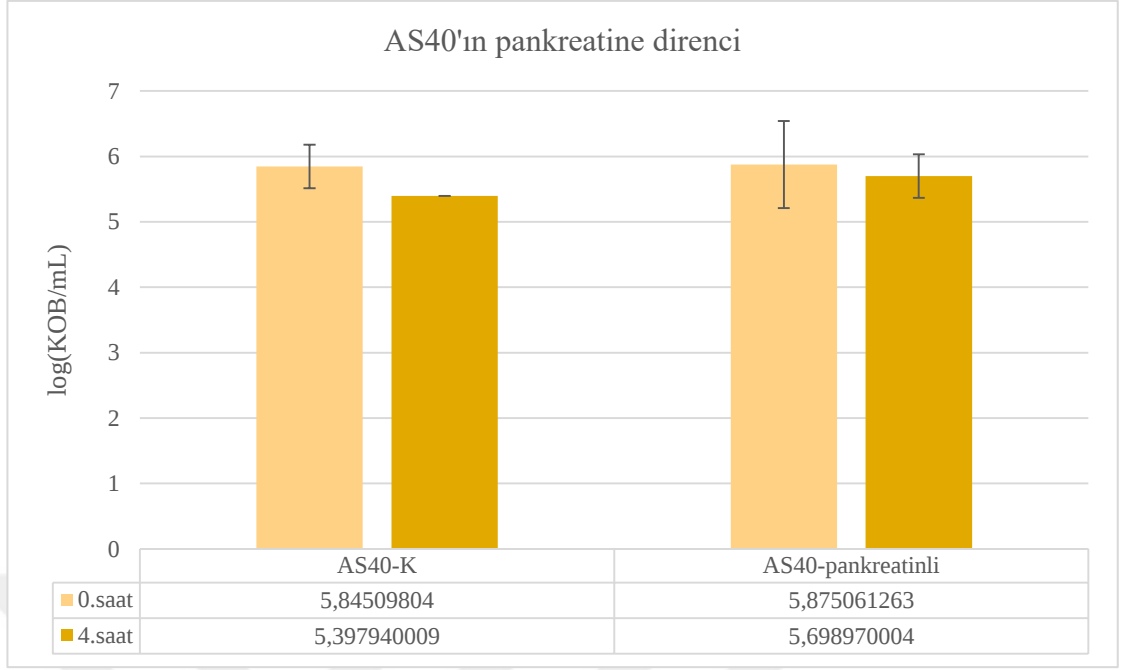
Bakteri izolatlarının pankreatine direncinin ölçüldüğü denemelere ait sonuçlar Şekil 4.18, 4.19, 4.20, 4.21, 4.22, 4.23'de verilmiştir.



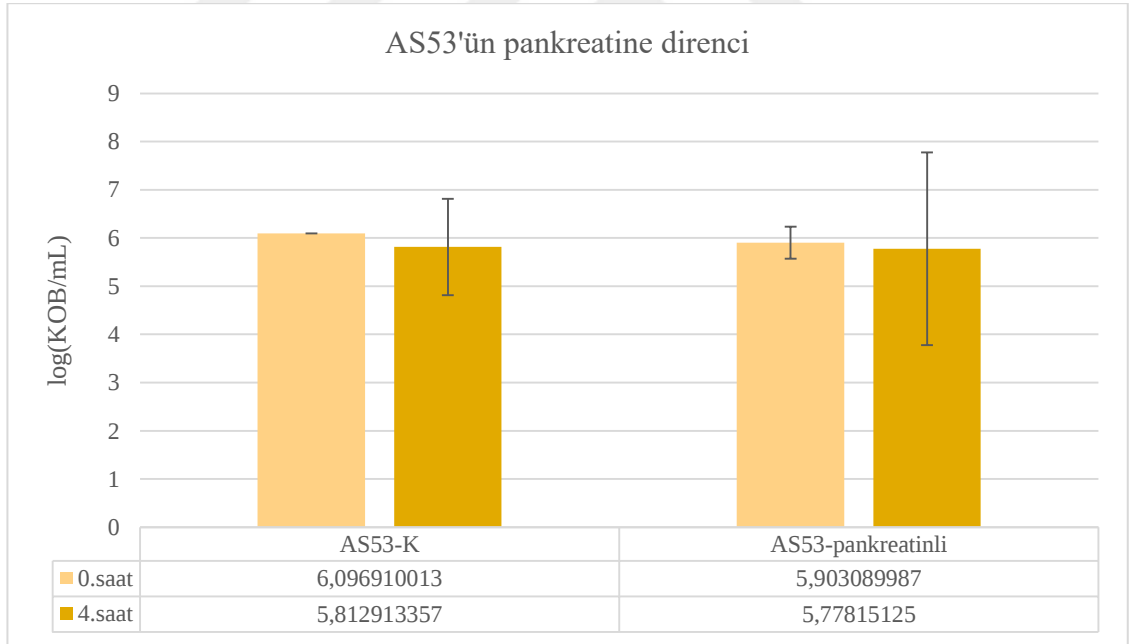
Şekil 4.18 AS26'nin pankreatine direnci (K: Kontrol= pankreatinsiz)



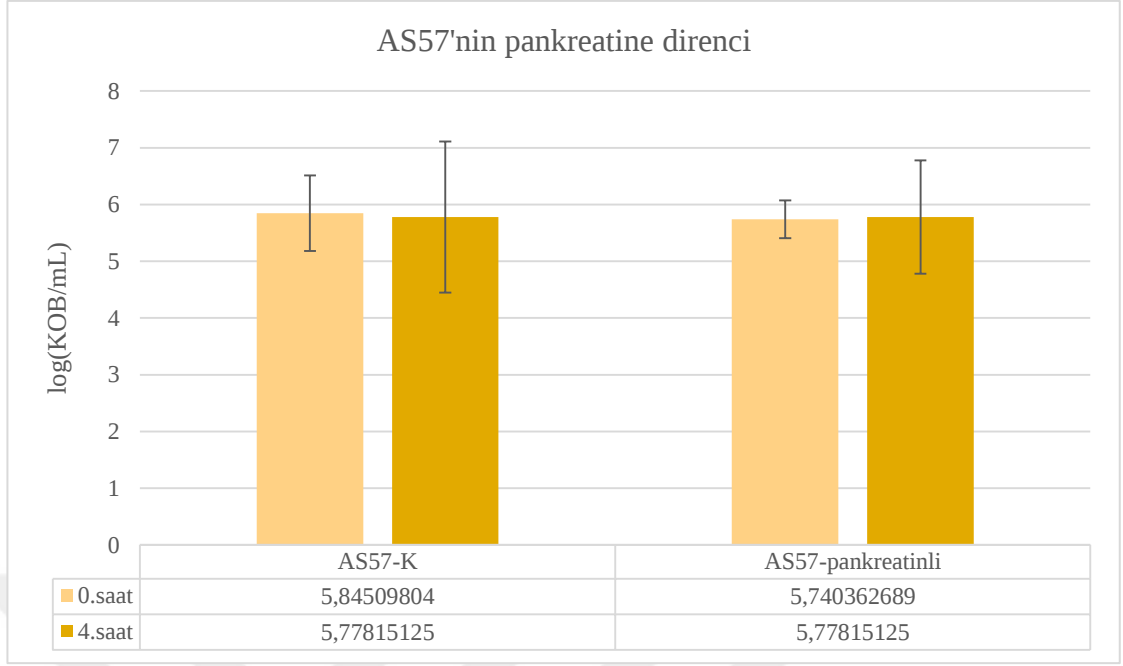
Şekil 4.19 AS32'nin pankreatine direnci (K: Kontrol= pankreatinsiz)



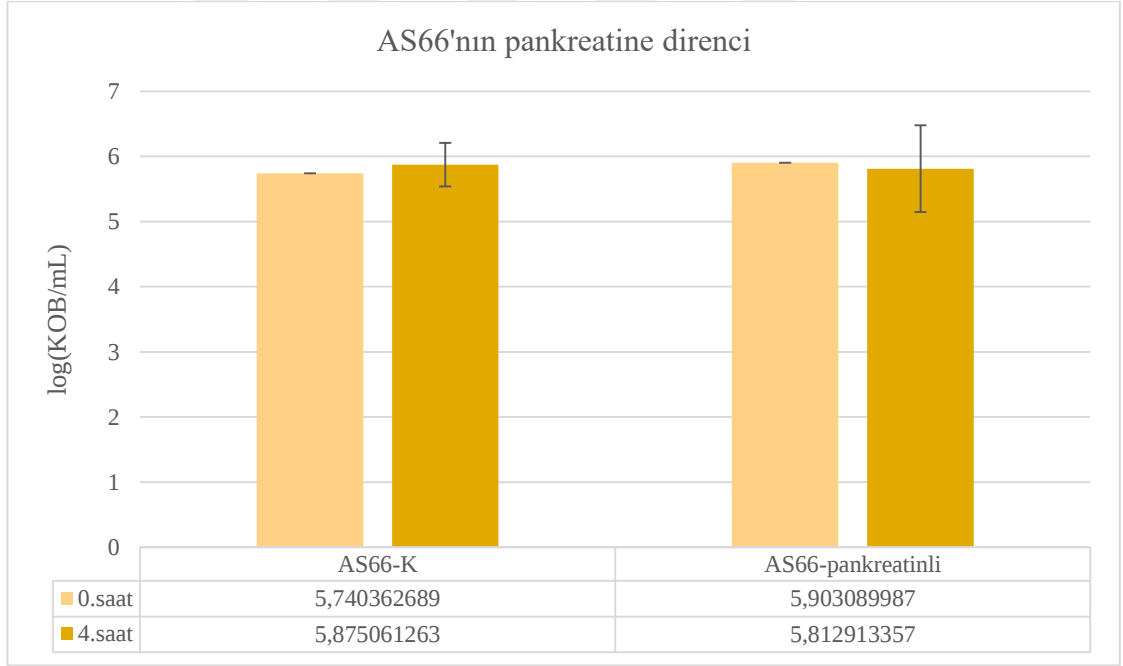
Şekil 4.20 AS40'ın pankreatine direnci (K: Kontrol= pankreatinsiz)



Şekil 4.21 AS53'ün pankreatine direnci (K: Kontrol= pankreatinsiz)



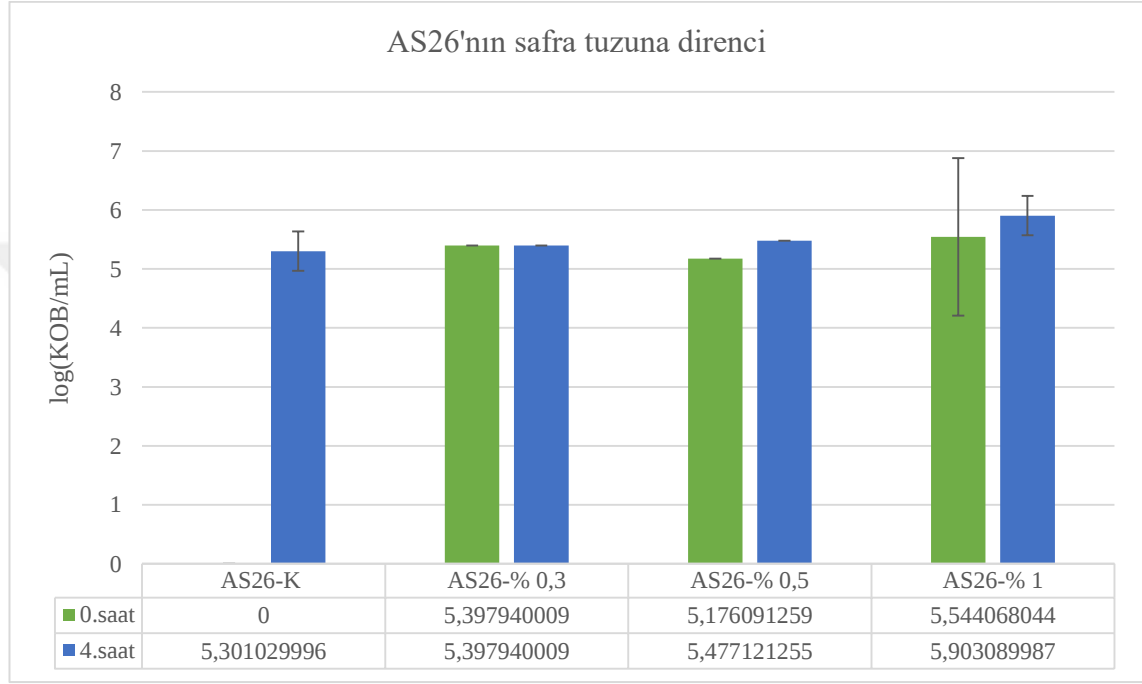
Şekil 4.22 AS57'nin pankreatine direnci (K: Kontrol= pankreatinsiz)



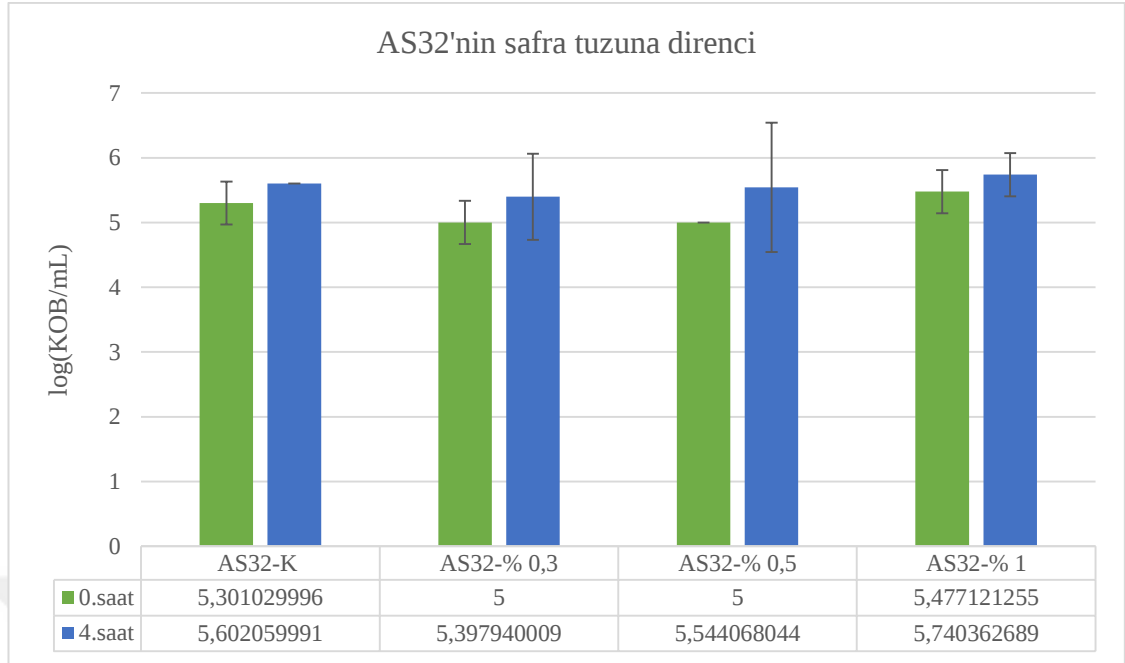
Şekil 4.23 AS66'nin pankreatine direnci (K: Kontrol= pankreatinsiz)

Bu sonuçlara göre, izolatların 4 saat boyunca pankreatine karşı canlılık oranları değişse de, tüm izolatların, 4 saat sonuna kadar, canlılıklarını sürdürdükleri saptanmıştır.

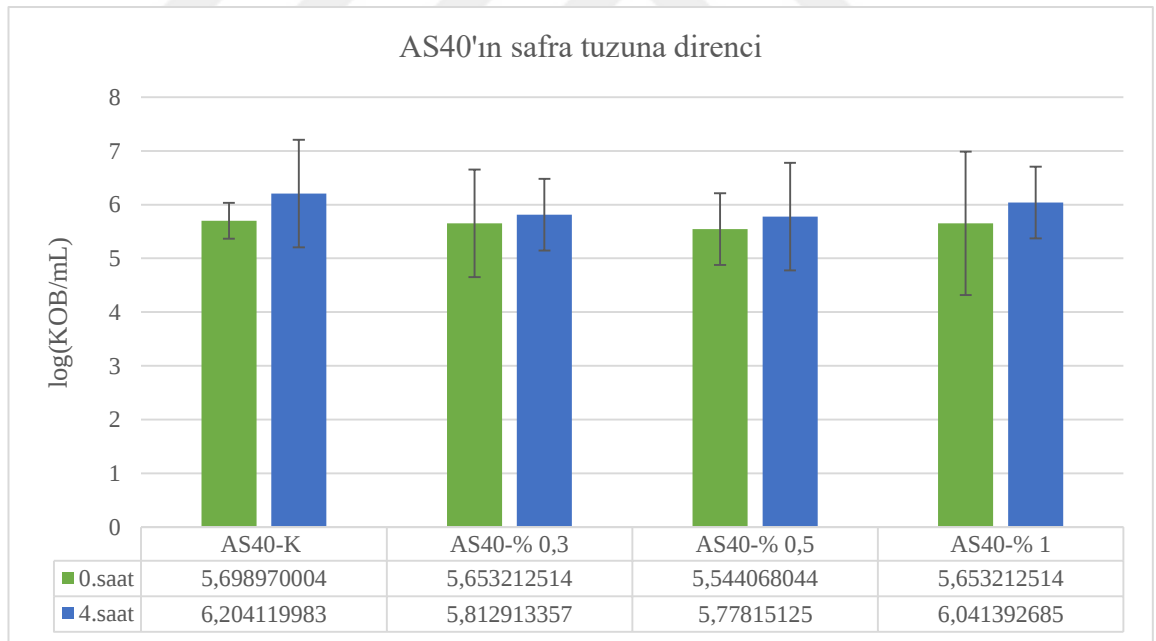
Safra tuzuna direncinin ölçüldüğü biyodeneme sonuçları ise Şekil 4.24, 4.25, 4.26, 4.27, 4.28, 4.29’da verilmiştir.



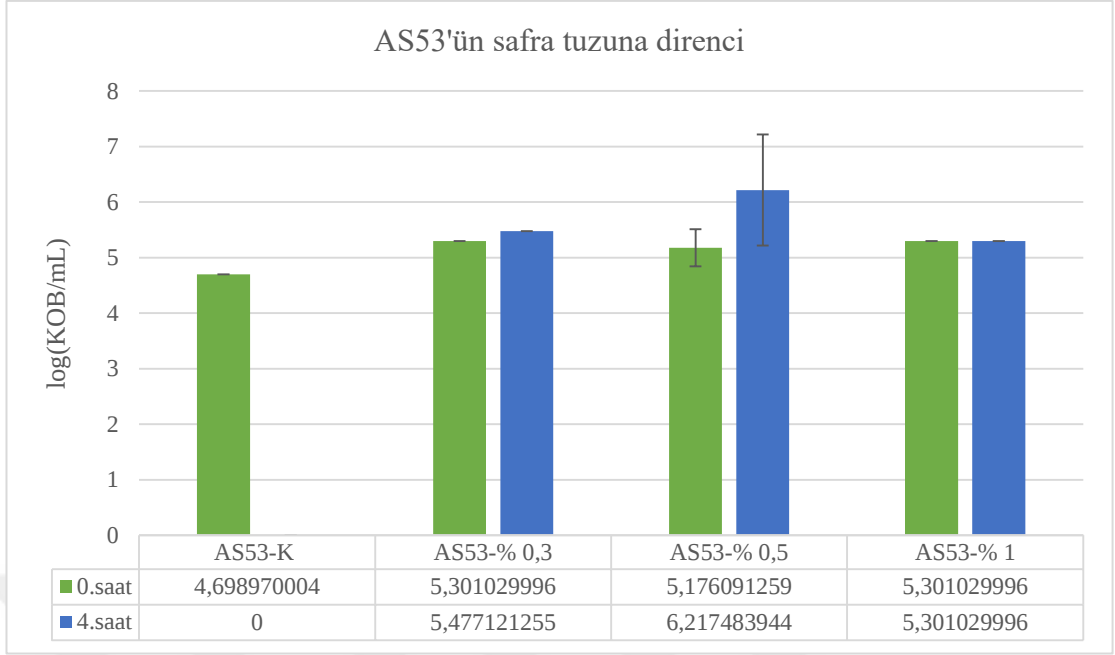
Şekil 4.24 AS26'nın safra tuzuna direnci (K: Kontrol= %0 safra tuzu, %0,3= %0,3 safra tuzu, %0,5= %0,5 safra tuzu, %1= %1 safra tuzu)



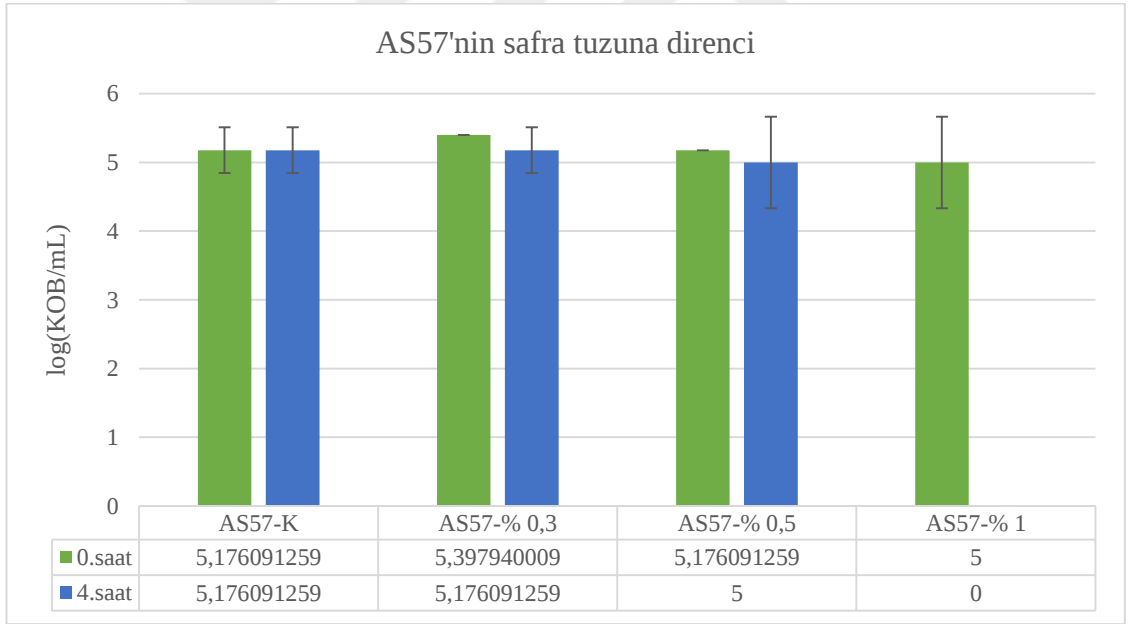
Şekil 4.25 AS32'nin safra tuzuna direnci (K: Kontrol= %0 safra tuzu, %0,3= %0,3 safra tuzu, %0,5= %0,5 safra tuzu, %1= %1 safra tuzu)



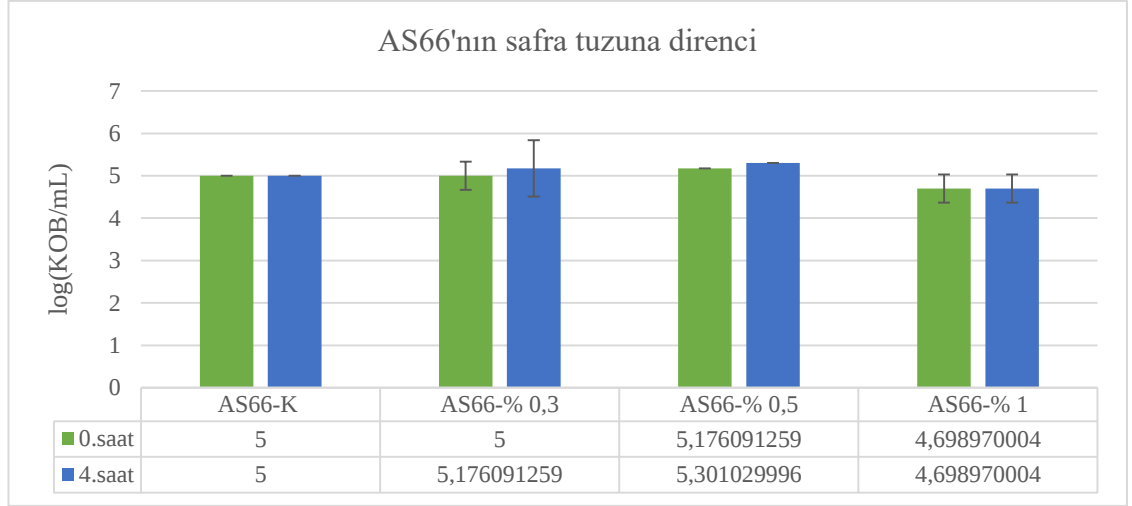
Şekil 4.26 AS40'ın safra tuzuna direnci (K: Kontrol= %0 safra tuzu, %0,3= %0,3 safra tuzu, %0,5= %0,5 safra tuzu, %1= %1 safra tuzu)



Şekil 4.27 AS53'ün safra tuzuna direnci (K: Kontrol= %0 safra tuzu, %0,3= %0,3 safra tuzu, %0,5= %0,5 safra tuzu, %1= %1 safra tuzu)



Şekil 4.28 AS57'nin safra tuzuna direnci (K: Kontrol= %0 safra tuzu, %0,3= %0,3 safra tuzu, %0,5= %0,5 safra tuzu, %1= %1 safra tuzu)



Şekil 4.29 AS66'nın safra tuzuna direnci (K: Kontrol= %0 safra tuzu, %0,3= %0,3 safra tuzu, %0,5= %0,5 safra tuzu, %1= %1 safra tuzu)

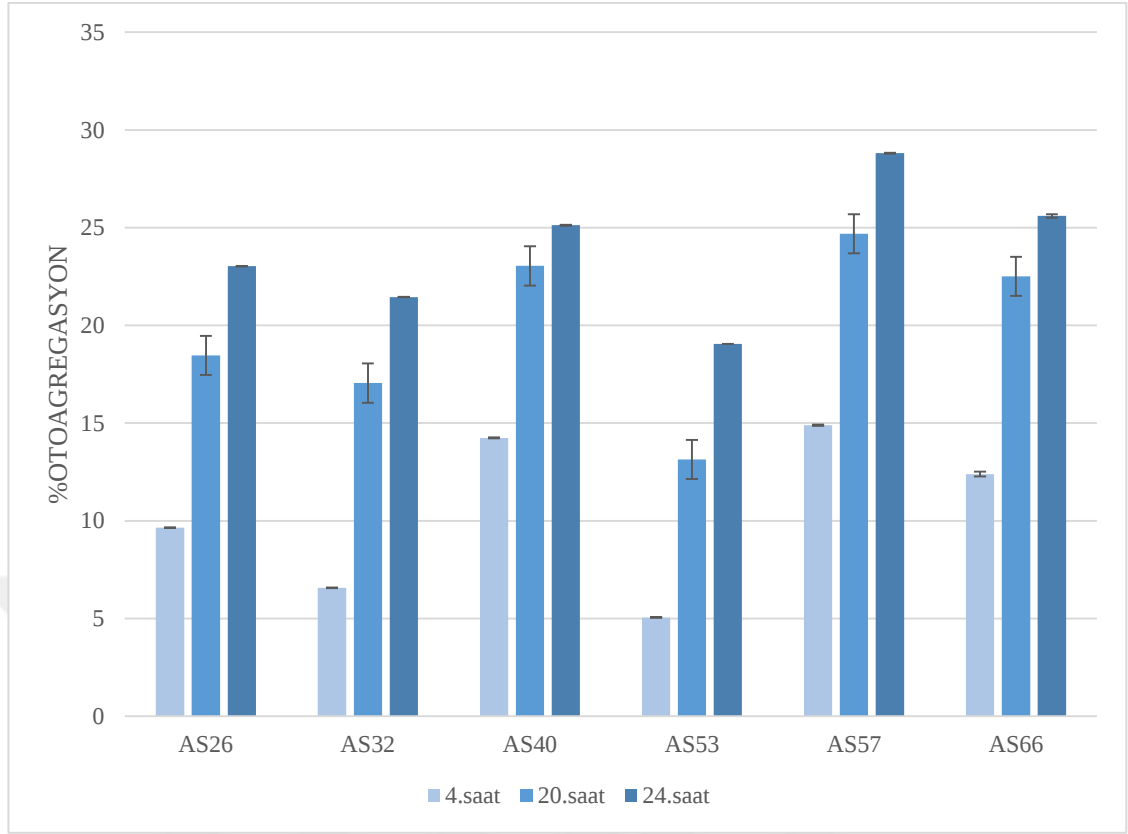
Bu sonuçlara göre, izolatların 4 saat boyunca safra tuzuna karşı canlılık oranları değişse de, tüm izolatların, 4 saat sonuna kadar, %0,3, %0,5 ve %1 oranlarında safra tuzu içeren ortamlarda, canlılıklarını sürdürebilme yeteneğinde oldukları tespit edilmiştir.

4.8 Otoagregasyon

İzolatların birbirlerine tutunma derecelerini belirlemek amacıyla yapılan otoagregasyon denemesinin sonuçları Çizelge 4.4'de ve Şekil 4.30'da verilmiştir.

Çizelge 4.4 İzolatların %otoagregasyonları

İzolat kodu	4.saat %otoagregasyon	20.saat %otoagregasyon	24.saat %otoagregasyon
AS26	9,7±0,017	18,5±0,015	23,03±0,011
AS32	6,6±0,018	17,05±0,005	21,45±0,009
AS40	14,2±0,024	23,04±0,019	25,13±0,028
AS53	5,05±0,005	13,13±0,019	19,05±0,004
AS57	14,9±0,029	24,7±0,025	28,81±0,021
AS66	12,4±0,122	22,51±0,091	25,6±0,092



Şekil 4.30 İzolatların %otoagregasyon sonuçları

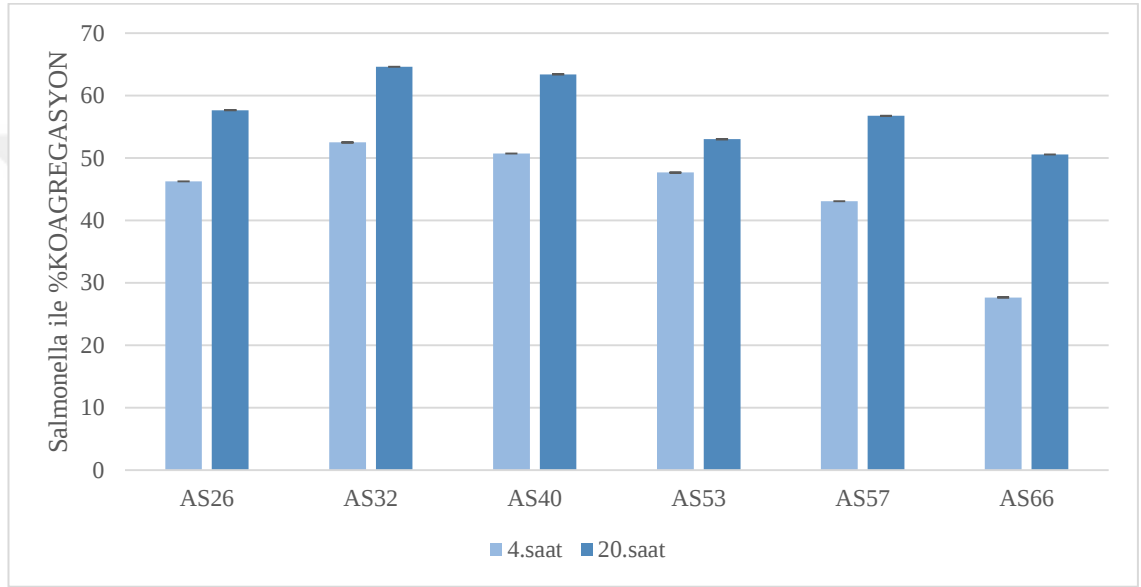
Otoagregasyon denemeleri sonucuna göre, izolatların % otoagregasyon oranları % 5,05 ile % 28,8 arasında tespit edilmiştir. Değerlendirilen bütün suşlar otoagregasyon özelliği göstermekle beraber, AS57 suşu, ölçüm yapılan tüm saatlerde en yüksek otoagregasyon kabiliyeti gösterirken, en düşük otoagregasyon yeteneğine sahip suş, AS53 olarak belirlenmiştir.

4.9 Koagregasyon

İzolatların, patojen bakterilerle etkileşime girerek kümeler oluşturma sürecini yani koagregasyonu belirlemek amacıyla yapılan ve *Salmonella* Typhimurium (Çizelge 4.5’de ve Şekil 4.31) ve *Listeria monocytogenes* (Çizelge 4.6’da ve Şekil 4.32) ile yürütülen koagregasyon denemelerinin sonuçları, aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.5 İzolatların *Salmonella* ile % koagregasyonları

İzolat kodu	4.saat %koagregasyon	20.saat %koagregasyon
AS26	46,2±0,007	57,6±0,01
AS32	52,5±0,011	64,6±0,008
AS40	50,7±0,005	63,4±0,014
AS53	47,7±0,003	53±0,023
AS57	43,06±0,007	56,8±0,015
AS66	27,7±0,009	50,6±0,009

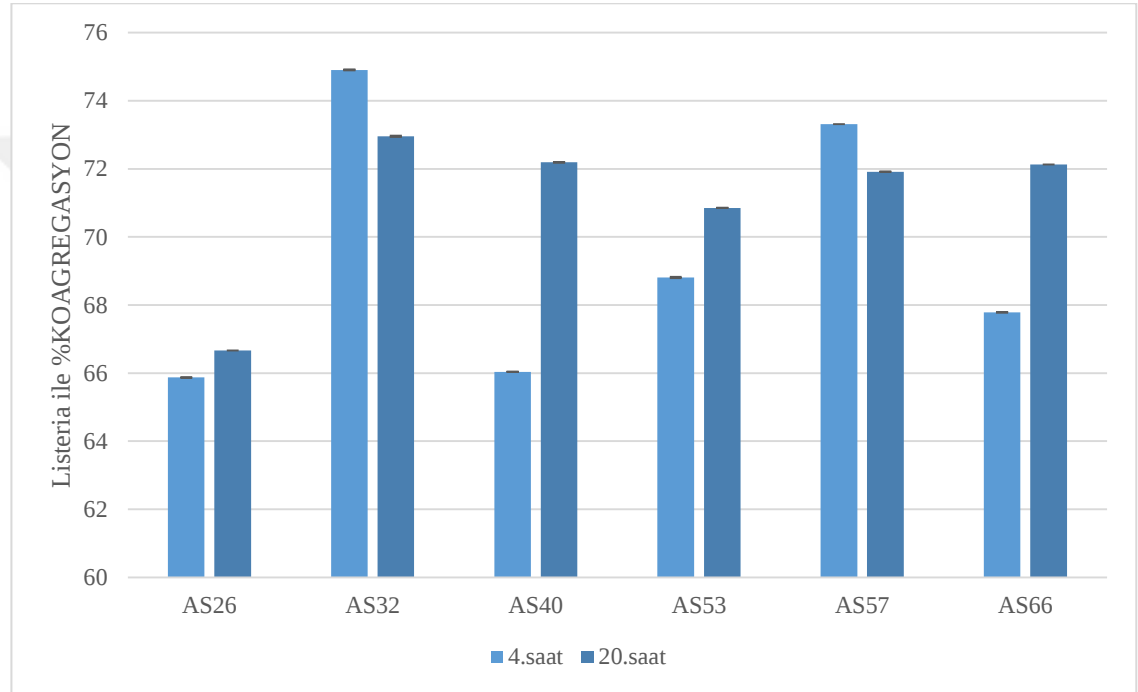


Şekil 4.31 İzolatların *Salmonella* ile % koagregasyon sonuçları (*Salmonella*: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028)

Koagregasyon sonucuna göre, izolatların *S. Typhimurium* ATCC 14028 suşu ile % koagregasyon oranları % 27,7 ile % 64,6 arasında tespit edilmiştir. Değerlendirilen bütün suşlar, patojen ile koagregasyon özelliği göstermekle beraber, AS32 suşu, ölçüm yapılan tüm saatlerde en yüksek koagregasyon kabiliyeti gösterirken, en düşük koagregasyon yeteneğine sahip suş, AS66 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.6 İzolatların *Listeria* ile %koagregasyonları

İzolat kodu	4.saat %koagregasyon	20.saat %koagregasyon
AS26	65,9±0,007	66,7±0,001
AS32	74,9±0,012	72,9±0,017
AS40	66,03±0,002	72,2±0,002
AS53	68,8±0,019	70,85±0,003
AS57	73,3±0,003	71,9±0,004
AS66	67,8±0,008	72,1±0,003

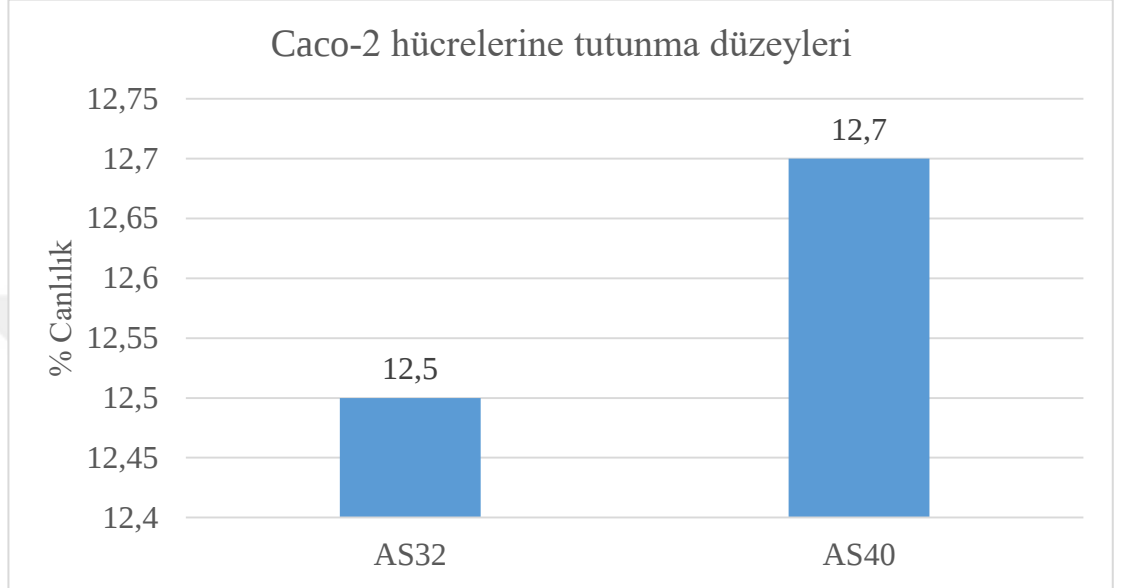


Şekil 4.32 İzolatların *Listeria* ile % koagregasyon sonuçları (*Listeria*: *Listeria monocytogenes*)

Koagregasyon sonucuna göre, izolatların *L. monocytogenes* ile % koagregasyon oranlarının % 65,9 ile %74,9 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Değerlendirilen bütün suşlar, patojen ile koagregasyon özelliği göstermekle beraber, AS32 suşu, ölçüm yapılan tüm saatlerde en yüksek koagregasyon kabiliyetine sahip bulunurken, en düşük koagregasyon yeteneğine sahip suş, AS26 olarak belirlenmiştir.

4.10 İzolatların Caco-2 hücrelerine tutunması

Agregasyon denemeleri sonucu, en verimli aktivite gösteren iki izolat olan AS32 ve AS40 için, Caco-2 hücrelerine tutunma testi sonuçları Şekil 4.33’de verilmiştir.



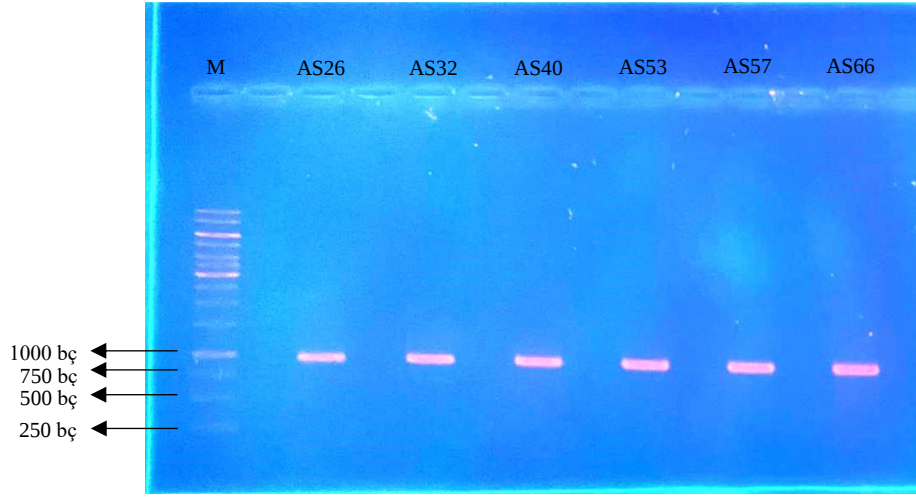
Şekil 4.33 AS32 ve AS40’ın Caco-2 hücrelerine tutunma düzeyleri

AS32 ve AS40’ın, Caco-2 hücrelerine tutunma düzeyleri sonucuna göre izolatlar sırasıyla, %12,5 ve %12,7 oranlarında tutunma gerçekleştirmiştir.

4.11 16S rDNA Dizi Analizi ile İzolatların Tanımlanması

4.11.1 16S rDNA bölgesinin PZR ile çoğaltılması

Antimikrobiyal aktiviteye sahip olan peynir kaynaklı izolatların, genotipik karakterizasyonunu gerçekleştirmek için, 6 farklı bakteriden izolasyonu yapılan genomik DNA’lar, 16S rDNA primerleri aracılığıyla çoğaltılmıştır. Çoğaltılan 16S rDNA bölgelerinin, 900 bp’lik agaroz jel üzerindeki görüntüleri Şekil 4.34’de verilmiştir.



Şekil 4.34 İzolatların çoğaltılmış 16S rDNA bölgelerinin PZR bant görüntüleri (M: Markör)

4.11.2 İzolatların tanısı

Çalışmada probiyotik özellikte belirlenen izolatların nihai tanısı, 16 rDNA dizi analiz verileri ve bu analizlerin NCBI veri tabanında değerlendirilmesi esas alınarak gerçekleştirilmiştir ve bu sonuçlar EK-1’de gösterilmiştir.

Bu verilere göre incelenen tüm izolatlar *Pediococcus acidilactici* suşları olarak tanımlanmıştır.

4.12 İstatistikî Analiz Sonuçları

Asidifikasyon denemeleri için yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre; stoklar, saatler ve stok-saat etkileşimi açıklayıcı, pH üzerinden belirlenen asidifikasyon yanıt değişkeni olarak ele alınıp kurulan tekrarlayan gözlemler ANOVA modeli sonuçlarına göre, stoklar ve saatin asidifikasyon üzerinde etkili olduğu ($p < 0.05$) gözlemlenmiştir. Bu modelin parametre tahminlerine göre saate göre asidifikasyonun arttığı tespit edilmiştir.

Proteolitik aktivite denemeleri için yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre; stokların açıklayıcı, zon çapı üzerinden belirlenen proteolitik aktivite yanıt değişkeni olarak ele

alınıp kurulan ANOVA modeli sonuçlarına göre, stokların proteolitik aktivite üzerinde istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bir etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Bu modelin parametre tahminlerince, saate göre proteolitik aktivitenin arttığı tespit edilmiştir.

Dekarboksilaz aktivitesi denemeleri için yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre; stokların açıklayıcı, zon çapı üzerinden belirlenen dekarboksilaz aktivitesinin yanıt değişkeni olarak ele alınıp kurulan ANOVA modeli sonuçlarına göre, stokların dekarboksilaz aktivitesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bir etkisi olduğu gözlemlenmiştir.

Düşük pH'a direnç denemeleri için yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre; saatin ve pH seviyesinin açıklayıcı, gözlemlenen koloni sayısının yanıt değişkeni olarak ele alındığı Poisson regresyon modelinde, saatin ve pH seviyesinin gözlemlenen koloni sayısını istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.001$) bir şekilde açıkladığı gözlemlenmiştir. Model katsayıları incelendiğinde, saatin, koloni sayısında, pH seviyesinden daha büyük bir etkisi olduğu gözlemlenmiştir.

Pepsine direnç denemeleri için yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre; stoğun, pH seviyesinin, saatin ve pepsin uygulamasının açıklayıcı; gözlemlenen koloni sayısının yanıt değişkeni olarak ele alındığı Poisson regresyon modelinin sapma analizinde, saatin ve kullanılan stokların anlamlı farklılıklar gösterdiği gözlemlenmiştir ($p < 0.01$). Model katsayıları incelendiğinde, koloni sayıları arasındaki farklılığın AS26, AS53 ve AS57 stoklarından kaynaklandığı görülmektedir.

Pankreatine direnç denemeleri için yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre; stoğun, pankreatin uygulamasının ve saatin açıklayıcı, koloni sayısının açıklanan değişken olarak alındığı Poisson regresyon modelinde, sadece stokların anlamlı olduğu gözlemlenmiştir. Bu çıkarımın ardından, aracı değişken analizine benzer bir şekilde, stok harici etkileri dikkate almak amacıyla modelden stok çıkarılıp kalan değişkenlerin etkisi incelenmiştir. Bu analizin sonucunda ise, stok etkisi göz ardı edildiğinde de, koloni sayısı üzerinde pankreatinin önemli bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir. Bu durum, koloni sayısının, bakteri sayısından ayrı bir ölçüt olarak kullanılmasından kaynaklanıyor olabilir.

Safra tuzuna direnç denemeleri için yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre; safra tuzu uygulamasının ve saatin açıklayıcı, gözlemlenen koloni sayısının açıklanan değişken olduğu modelde; stok, saat ve stok-safra tuzu oranı etkileşiminin mantıklı olduğu gözlemlenmiştir ($p < 0.05$). Model parametreleri incelendiğinde, AS40 ve AS57 stoklarının safra tuzu ile etkileşiminin anlamlı olduğuna kanaat getirilmiştir ($p < 0.05$).

Otoagregasyon denemeleri için yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre; stokların ve zamanın açıklayıcı, optik densite aracılığıyla hesaplanmış otoagregasyonun açıklanan değişken olarak alındığı tekrarlayan gözlemlili ANOVA modelinde, stokların otoagregasyon üzerinde anlamlı bir etkisi olduğu gözlemlenmiştir ($p < 0.01$). Model parametreleri incelendiğinde, otoagregasyon üzerindeki etkileri açısından stoklar; (çoktan aza) AS57, AS40, AS66, AS26, AS32 ve AS53 olarak sıralanmaktadır.

Koagregasyon denemeleri için yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre; bakteriler arasındaki etkileşim çiftleri ve saat açıklayıcı, optik densite yoluyla gözlemlenmiş koagregasyon açıklanan değişken olmak üzere kurulan tekrarlayan gözlemlili ANOVA modelinin sonuçlarına göre, bütün etkileşimler koagregasyon açısından anlamlıdır ($p < 0.05$).

Caco-2 hücrelerine tutunma denemeleri için yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre; stokların açıklayıcı, Caco-2 tutunmasının açıklanan değişken olarak alındığı Poisson regresyonu modelinde, stokların tutunma üzerindeki etkisinin olduğu gözlemlenmiştir ($p < 0.001$). Ancak model parametreleri incelendiğinde stoklar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlenmektedir.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Peynir, yüzyıllardır insan beslenmesinin ayrılmaz bir parçası olan karmaşık ve yaygın olarak tüketilen bir süt ürünüdür. Peynir üretimi, çeşitli mikroorganizmaların, özellikle laktik asit bakterilerinin (LAB), faaliyetlerine büyük ölçüde dayanan çok yönlü bir süreçtir (Henning vd. 2006). Laktik asit bakterileri, peynir üretiminde kritik bir rol oynamakta ve son ürünün karakteristik lezzetinin, dokusunun ve güvenliğinin gelişimine katkıda bulunmaktadır. Aynı zamanda, peynir de dahil olmak üzere fermente gıdaların üretiminde baskın mikroorganizmalardır (Voidarou vd. 2020). Bu bakteriler, peynir sütünde, peynir yapım sürecinde kritik bir adım olan hızlı asitlenmeden sorumludurlar. Asitlenme hızı ve derecesi, peynirin başlangıç dokusunu belirlemektedir. Laktik asit bakterileri, sütteki ana şeker olan laktozu metabolize etmekte ve laktik aside dönüştürmektedir. Bu da peynir sütü pH'ını düşürmekte ve süt proteinlerinin pıhtılaşmasına yardımcı olmaktadır (Murtaza vd. 2014). Peynir olgunlaşması sırasında meydana gelen biyokimyasal değişiklikler de nihai lezzet profilinin gelişimi için çok önemlidir. Laktik asit bakterileri, glikoliz ve proteoliz dahil olmak üzere, çeşitli metabolik yollarla bu değişikliklere katkıda bulunmaktadır (Forde ve Fitzgerald 2000, Andiç vd. 2015).

LAB, konak sağlığı üzerinde çeşitli faydalı etkiler göstererek gastrointestinal sistemde de kritik bir rol oynamaktadır. Konak gastrointestinal gelişimini teşvik etme, sindirim fonksiyonunu artırma, mukozal toleransı artırma, bağışıklık tepkilerini güçlendirme ve hastalıklara karşı direnci artırma yetenekleri nedeniyle, bağırsakta olumlu mikroorganizmalar olarak kabul edilmektedirler (Ringø vd. 2018). Bu bakteriler, fermentasyon sırasında, laktik asit üretme kapasiteleri ile işlevsel özelliklerine katkıda bulunmaktadır. Bu özellikleriyle beraber, organik asitler, hidrojen peroksit ve bakteriyosinler gibi zararlı bağırsak bakterilerinin büyümesini engelleyen antimikrobiyal bileşikler üretmekte ve sağlıklı bir bağırsak ortamının korunmasına yardımcı olmaktadır (Lombogia vd. 2020). Dahası, LAB'nin bağışıklık sistemini uyarma, lipid birikimini inhibe etme ve enerji metabolizmasını artırma ile ilişkilendirildiği, konak sağlığındaki çeşitli işlevlerini göstermektedir (Gu vd. 2022).

Yukarıda kısaca bahsedilen bilgiler ışığında, tez çalışmamızda, farklı yörelerden temin edilen, geleneksel olarak, starter kültür kullanılmaksızın üretilmiş, 8 adet peynir örneğinden, antimikrobiyal aktivite gösteren 6 laktik asit bakteri izolatı ile çalışmalar yürütülmüştür. Bu izolatların, peynir üretiminde starter kültür olarak kullanılabilirliği açısından teknolojik olarak önemli bazı özellikleri (asit üretme yetenekleri, proteolitik ve dekarboksilaz aktiviteleri, bakteriyosin üretimi ve değişik indikatör bakterilere karşı bakteriyosinin aktivite spektrumu, in vitro koşullarda suşların gastrointestinal sistemde düşük pH, pepsin, pankreatin, safra tuzuna karşı dirençliliği) ve biyokimyasal testler/16S rRNA gen sekanslama yöntemi ile tanımlamaları yapılmıştır.

Antimikrobiyal aktivite yeteneğine sahip bakterilerin genelinde görüldüğü gibi, patojenlere karşı gösterdikleri inhibisyon etkisi, bakteriyosin üretiminden kaynaklanmaktadır. Bu bulgu sonucunda, bakteriyosinlerin, bakteriler aracılığıyla yaygın olarak üretilmesi fikri desteklenmektedir. Günümüzde hala kabul edilen bu fikre göre, doğada bütün bakterilerin, en az bir tür bakteriyosin metaboliti ürettiği öne sürülmektedir (Hernandez vd. 2005). Buna göre, izolatların, antimikrobiyal aktivite spektrumunun belirlenmesi amacıyla, bazı patojenlerle yapılan kuyu difüzyon denemesi sonucu, izolatların tümünün, en az bir patojene karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Çalışmada yararlanılan yedi patojene de karşı inhibitör etki gösteren tek suşun, AS26 olduğu tespit edilmiştir. Diğer 5 izolatın, zon çaplarına bakılarak elde edilen sonuçlara göre, patojenlere karşı en çok inhibitör etkiye sahip suşlar da sırasıyla; AS53, AS57, AS32, AS66, AS40 olarak saptanmıştır.

Gram boyama denemesi sonucuna göre, antimikrobiyal etki gösteren 6 izolat da, ışık mikroskobu altında Gram pozitif olarak görülmüştür. Dolayısıyla, Gram pozitif laktik asit izolatlarının, fermantasyon yoluyla ürettiği asitler, kimyasal bileşenler ve metabolitler gibi yapıların, Gram negatif patojenlerin membran yapılarını bozarak, antimikrobiyal aktiviteyi arttırıcı etkilerinin olması yüksek ihtimaldir.

LAB, laktik asidi, laktoz fermantasyonunun ana son ürünü olarak üreterek, asitleşme sürecinde önemli rol oynamaktadır (Mayo vd. 2021). Asitleşme aktivitesinin artması, peynir gibi fermente ürünlerde olduğu gibi, nihai ürünün duyuusal özelliklerine (tat, doku,

aroma) katkıda bulunmakta ve aynı zamanda patojenlere karşı koruma sağlamaktadır (Casey vd. 2015). Buna göre, izolatların asidifikasyon aktivitesi denemeleri sonucu, 6 saat sonunda, pH'ı en çok düşüren yani en çok asit üreten izolatların AS53, AS32 ve AS57 olduğu tespit edilmiştir. Diğer yandan, 24 saat sonunda, en çok asit üreten izolatların AS26 ve AS57 olduğu saptanmıştır. Deney sonucunda, tüm izolatların, 24 saat sonraki Δ pH değerleri hesaplanmış ve hepsinin 2'nin üzerine çıktığı belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, 24 saat sonunda hesaplanan Δ pH'ın 2.09 olduğu *Lc. lactis* spp. *lactis* PeLc2 suşunun, yüksek asidifikasyon yeteneği nedeniyle endüstriyel fermantasyonlar için potansiyel bir suş olabileceği belirtilmiştir (Ertürkmen ve Öner 2015).

LAB, gıda fermantasyonu endüstrisinde fonksiyonel starter kültürler olarak kullanılmakta ve proteolitik aktiviteleri, fermente ürünlerde aroma gelişimine ve dokuya katkıda bulunmaktadır (Leroy ve Vuyst 2004). Hücre içi enzimlerin, özellikle proteazların serbest bırakılmasını sağlayan proteolitik aktivite, laktik asit bakterilerinin belirgin bir özelliğidir ve peynir üretimi gibi süreçler için kritiktir (Kandil ve Soda 2015). Çalışmalar, laktik asit bakterisi izolatlarının önemli bir yüzdesinin proteolitik aktivite sergilediğini göstermiştir ve bu enzimlerin çeşitli uygulamalardaki önemini vurgulamaktadır (Silva vd. 2019). Buna göre, izolatların proteolitik aktivitesi denemeleri sonucu, 6 izolatın da zon verdiği ve sonuç olarak proteolitik aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir.

Peynirin olgunlaşma süreci boyunca, özellikle starter LAB, peynirin lezzetini ve kalitesini etkileyebilen amino asit dekarboksilasyon süreçlerinde yer almaktadır (Marino vd. 2008). Starter LAB, esas olarak laktoz fermantasyonu ve laktik asit üretiminden sorumludurlar (Hassanzadazar vd. 2017). Ayrıca, laktik asit bakterilerinin fermantasyon sırasında, biyojen aminler ürettiği bilinmekte ve bu durum peynirin güvenliği ve kalitesini etkileyebilmektedir (Visciano ve Schirone 2022). Peynirin güvenliği ve kalitesi için LAB'nin, dekarboksilasyon yeteneğine sahip olması gerekmektedir. Buna göre, izolatların dekarboksilaz aktivitesi denemeleri sonucu, 6 izolatın da zon verdiği ve sonuç olarak dekarboksilaz aktivitesi gösterdikleri tespit edilmiştir.

Gıda maddelerinin sindirimi sırasında besinler, midede yaklaşık 3 saat boyunca kalmaktadır. Bu süre zarfında, midedeki pH oranı 1 ile 4 arasında değişmektedir. Probiyotik mikroorganizmaların ise, GİS'e ulaşmadan önce, midedeki bu düşük pH koşullarında hayatta kalabilmesi gerekmektedir (Vinderola ve Reinheimer 2003). Buna göre, düşük pH'a direnç denemeleri sonucu tüm izolatların, 3 saat boyunca, pH 1.0, 2.0 ve 3.0'te canlılıklarını kaybetmedikleri ve dirençli oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca, LAB'nin probiyotik özelliklerini etkili bir şekilde gösterebilmeleri için pepsin ve pankreatin enzimatik aktivitesine dayanıklı olmaları gerekmektedir. Bazı LAB suşlarının pepsin ve pankreatine tolerans gösterebildiği ve probiyotik olarak potansiyellerini vurguladığı tespit edilmiştir (Kang vd. 2019). Buna göre, pepsine direnç denemeleri sonucu tüm izolatların 3 saat boyunca, pH 2.0 ve 3.0'te canlılıklarını kaybetmedikleri ve dirençli oldukları tespit edilmiştir. Pankreatine direnç denemeleri sonucu ise tüm izolatların, 4 saat boyunca, pH 8.0'deki bir pankreatin çözeltisinde varlıklarını devam ettirebildikleri saptanmıştır. LAB'nin, safra tuzlarının varlığında serum kolesterol seviyelerini azaltabileceği bildirilmiştir, bu da LAB'nin yararlı etkileri için safra tuzlarının önemini göstermektedir (Hamed 2021). GİS'deki safra tuzunun konsantrasyonu, %0.3 ile %0.5 oranlarında değişmektedir (Begley vd. 2005). Buna göre, safra tuzuna direnç denemeleri sonucu tüm izolatların, 4 saat boyunca, %0,3, %0,5 ve %1 oranlarında safra tuzu içeren ortamlarda, canlılıklarını devam ettirdikleri ve dirençli oldukları saptanmıştır.

LAB'nin, otoagregasyon ve koagregasyon yetenekleri, hem probiyotik etkinlik hem de bağırsak sağlığı açısından önemlidir. Aynı zamanda peynir üretiminde ve kalitesinde de kritik öneme sahiptir. Bu süreçler, mikrobiyal stabiliteyi artırır, olgunlaşma sürecini optimize eder ve peynirin nihai lezzet ve tekstür özelliklerini geliştirir. Otoagregasyon yetenekleri, peynirin homojen olgunlaşmasında, biyofilm oluşturarak bakterilerin peynir yüzeylerinde ve iç yapısında hayatta kalmasını sağlamasında etkilidir. Koagregasyon yetenekleri ise, peynirin mikrobiyal dengesini sağlamada ve patojen mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmede etkilidir (Hevia vd. 2013, Collado vd. 2007). Buna göre, otoagregasyon denemeleri sonucu 6 izolatın da otoagregasyon yeteneğinin olduğu ve %otoagregasyonlarının %5,05 ile %28,8 arasında olduğu tespit edilmiştir. AS57 suşu, tüm saatlerde en yüksek otoagregasyon kabiliyeti göstermiş, en düşük otoagregasyon

yeteneğine sahip suş, AS53 olarak saptanmıştır. Koagregasyon denemeleri sonucu, 6 izolatın da *Salmonella* ve *Listeria* patojenlerine karşı koagregasyon yeteneğinin olduğu tespit edilmiştir. İzolatların *Salmonella* ile olan % koagregasyonları, % 27,7 ile % 64,6 arasında olduğu ve AS32 suşunun en yüksek koagregasyon özelliği, AS66 suşunun ise en düşük koagregasyon özelliği gösterdiği saptanmıştır. İzolatların *Listeria* ile olan % koagregasyonları, % 65,9 ile % 74,9 arasında olduğu ve AS32 suşunun yüksek koagregasyon özelliği, AS26 suşunun ise daha düşük koagregasyon özelliği gösterdiği saptanmıştır.

LAB'nin adezyon yeteneğini ve probiyotik potansiyelini değerlendirmek için, Caco-2 hücreleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Caco-2 hücrelerine etkili bir şekilde yapışan LAB suşlarının, *Salmonella* gibi patojenik bakterilere karşı bu hücreleri koruma konusunda umut vaat ettiği gösterilmiştir (Hai vd. 2021). Araştırmalar, belirli LAB suşlarının zorlu koşullar altında hayatta kalabildiğini, patojen üremesini engellediğini ve Caco-2 hücrelerine yapışabildiğini, böylece probiyotik olarak potansiyel taşıdığını göstermiştir (Feng vd. 2016). Otoagregasyon ve koagregasyon sonuçlarına göre en iyi sonucu veren iki izolatın, Caco-2 hücrelerine tutunma denemesi yapılmıştır. Buna göre AS32 ve AS40 izolatlarının, Caco-2 hücrelerine tutunma düzeyleri sırasıyla, %12,5 ve %12,7 oranlarında tespit edilmiştir.

Yukarıda özetlenen veriler ışığında probiyotik potansiyelleri detaylı bir şekilde döküme edilen geleneksel Türk peynirleri kökenli 6 adet izolatın, 16S rDNA dizi analizi çalışması sonucunda *Pediococcus acidilactici* suşu olduğu belirlenmiştir. Bu suşların tez çalışmasında denenen tüm fizyolojik testlere birbirinden farklı sonuç vermesi, her birinin ayrı *P. acidilactici* suşu olduğuna işaret etmektedir. İnsan sağlığına yarar sağlayan olgunlaşmış veya olgunlaşmamış peynir ürünleri olarak tanımlanan probiyotik peynir çeşitleri, pastörize çiğ süt veya pıhtıya presleme sonrası yardımcı fermentasyon maddesi olarak probiyotiklerin eklenmesi, peynir altı suyunun uzaklaştırılması ve ana fermentasyon maddelerinin eklenmesiyle üretilmektedir (da Cruza vd. 2009). Eklenen bu probiyotik yardımcı kültürler, peynir üretiminin ve olgunlaşmasının, dokusunun ve lezzetinin üzerinde belirleyici etkilere sahiptir. Bu etkiler probiyotik proteazlar, lipazlar veya diğer mikrobiyal enzimler veya metabolitlerden (örn. laktazlar, hücre dışı

polisakkaritler, antibakteriyel bileşikler ve aşağı yönlü fonksiyonel bileşenler) kaynaklanmakta ve peynirin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin yanı sıra lezzetini ve kalitesini de etkilemektedir (Settanni ve Moschetti 2010, Plessas vd. 2012). Şu anda *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Staphylococcus* ve *Enterococcus* gibi probiyotikler, insan sağlığına faydalı ürünler kazandırmak ve aynı zamanda gıda güvenliğini tehlikeye atan zararlı mikroorganizmaların üremesini engellemek için peynir kültürlerine eklenmektedir (Eugster vd. 2019; Heo vd. 2020). Bu tür girişimler, peynir algımızı şu şekilde değiştirmiş ve peynir, giderek artan bir şekilde, maksimum sağlık yararı için probiyotik organizmaların uzun vadeli yaşayabilirliğini destekleyen biyomatriks içeren probiyotik olarak kabul edilmeye başlanmıştır.

P. acidilactici, Gram pozitif fakültatif anaerobik laktik asit bakterisidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda potansiyel probiyotik değeri olan çeşitli *P. acidilactici* suşları tanımlanmıştır (Abbasiliasi vd. 2017, Gupta ve Sharma 2017, Ghazanfar ve Arif 2019). Bu suşların; serum lipitleri, inflamatuvar adezyon molekülleri ve inflamatuvar faktörlerin seviyelerini düzenleyerek sıçanlarda erken aterosklerozun etkili bir şekilde önlenmesi ve hafifletilmesi dahil olmak üzere önemli fonksiyonel özellikler sergilediği de saptanmıştır (Wang vd. 2019). Çalışmamızda farklı peynir türlerinden izole edilerek probiyotik özellikleri tanımlanan altı suşun tamamının *P. acidilactici* suşları olarak belirlenmesi, bu bakterinin güçlü probiyotik potansiyeline dikkat çeken en önemli noktadır. Bu özellikleri nedeniyle çalışmamızda tanımlanan tüm suşların, geleneksel ve endüstriyel peynir üretim süreçlerinde probiyotik katkı bileşenleri olarak kullanımını öneriyoruz. Ancak bu aşamaya ulaşmak için söz konusu suşların sağlığa yararlı etkilerinin hayvan denemeleri ile detaylı bir şekilde döküme edilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abbasiliasi, S., Tan, J. S., Bashokouh, F., Ibrahim, T. A. T., Mustafa, S., Vakhshiteh, F. ve Ariff, A. B. 2017. In vitro assessment of *Pediococcus acidilactici* Kp10 for its potential use in the food industry. *BMC microbiology*, 17, 1-11.
- Afshari, R., Pillidge, C. J., Read, E., Rochfort, S., Dias, D. A., Osborn, A. M. ve Gill, H. 2020. New insights into cheddar cheese microbiota-metabolome relationships revealed by integrative analysis of multi-omics data. *Scientific Reports*, 10(1), 3164.
- Akoglu, A., Yaman, H. ve Coskun, H. 2016. Mengen peynirinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, moleküler tanımlanması ve bazı starter kültür özelliklerinin belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilim Enstitüsü Derg*, 21, 453.
- Andiç, S., Tunçtürk, Y., & Boran, G. 2015. Changes in volatile compounds of cheese. Processing and impact on active components in food, 231-239.
- Antonsson, M., Molin, G. ve Ardö, Y. 2003. *Lactobacillus* strains isolated from Danbo cheese as adjunct cultures in a cheese model system. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1-2), 159-169.
- Araújo, E. A., dos Santos Pires, A. C., Pinto, M. S., Jan, G. ve Carvalho, A. F. 2012. Probiotics in dairy fermented products. *Rijeja: Intech*, 3, 129-48.
- Balouiri, M., Sadiki, M. ve Ibsouda, S. K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.
- Banwo, K., Sanni, A. ve Tan, H. 2013. Technological properties and probiotic potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from cow milk. *Journal of Applied Microbiology*, 114(1), 229-241.
- Bartholomew, J. W. ve Mittwer, T. 1952. The gram stain. *Bacteriological reviews*, 16(1), 1-29.
- Bayram, M. ve Yıldırım, Z. 2016. Beyaz peynirden bakteriyosin üreten bakterinin (*Enterococcus faecium*) izolasyonu ve bakteriyosinin karakterizasyonu. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, (13), 103-115.
- Beasley, S. S. ve Saris, P. E. 2004. Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk. *Applied and environmental microbiology*, 70(8), 5051-5053.
- Begley, M., Gahan, C.G. ve Hill, C. 2005. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29; 625-651.
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L. ve Cogan, T. M. 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International dairy journal*, 11(4-7), 259-274.

- Bhunia, A. K., Johnson, M. C., Ray, B. ve Kalchayanand, N. 1991. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *Journal of Applied Microbiology*, 70(1), 25-33.
- Biswas, S. R., Ray, P., Johnson, M. C. ve Ray, B. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(4), 1265-1267.
- Buffa, M., Guamis, B., Saldo, J., and Trujillo, A. J. 2004. Changes in organic acids during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or highpressure- treated goats' milk. *LWT* 37, 247–253.
- Burns, P., Cuffia, F., Milesi, M., Vinderola, G., Meinardi, C., Sabbag, N. ve Hynes, E. 2012. Technological and probiotic role of adjunct cultures of non-starter lactobacilli in soft cheeses. *Food microbiology*, 30(1), 45-50.
- Cabello-Olmo, M., Oneca, M., Pajares, M. J., Jiménez, M., Ayo, J., Encío, I. J. ve Araña, M. 2022. Antidiabetic effects of *Pediococcus acidilactici* pA1c on HFD-induced mice. *Nutrients*, 14(3), 692.
- Cakmakci, S. 2011. Türkiye Peynirleri (Cheeses of Turkey). *Peynir Biliminin Temelleri*, 598-600.
- Carr, F. J., Chill, D. ve Maida, N. 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey, In: *Critical reviews in microbiology*, 28(4), 281-370.
- Casey, E., Mahony, J., Neve, H., Noben, J. P., Dal Bello, F., & van Sinderen, D. 2015. Novel phage group infecting *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, as revealed by genomic and proteomic analysis of bacteriophage Ldl1. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(4), 1319-1326.
- Cheah, S. A., Chai, C. Y., Tan, I. S., Foo, H. C. Y. ve Lam, M. K. 2022. New prospect of algae for sustainable production of lactic acid: Opportunities and challenges. *Progress in Energy and Environment*, 19-28.
- Coelho, M. C., Malcata, F. X. ve Silva, C. C. 2022. Lactic acid bacteria in raw-milk cheeses: From starter cultures to probiotic functions. *Foods*, 11(15), 2276.
- Collado, M. C., Surono, I., Meriluoto, J. Ve Salminen, S. 2007. Indigenous dadih lactic acid bacteria: cell-surface properties and interactions with pathogens. *Journal of food Science*, 72(3), M89-M93.
- Collins, J.K., Thornton, G., Sullivan, G.O., 1998. Selection of Probiotic Strains for Human Applications. *Int. Dairy J.*, 8: 487-490.
- Conway, P. L., Gorbach, S. L. ve Goldin, B. R. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of dairy science*, 70(1), 1-12.

- Corthier, G. 2004. The health benefits of probiotics Danone Nutritopics. Route Departmentale Palaiseau Cedex, France, 17, 1-4.
- Çakmakçı, S., ve Salık, M. A. 2021. Türkiye'nin coğrafi işaretli peynirleri. Akademik Gıda, 19(3), 325-342.
- Çomak-Göçer E.M.Ç., Ergin F., Küçükçetin A., 2016. Sindirim Sistemi Modellerinde Probiyotik Mikroorganizmaların Canlılığı. Akademik Gıda, 14 (2): 158-165.
- da Cruz, A. G., Buriti, F. C. A., de Souza, C. H. B., Faria, J. A. F. ve Saad, S. M. I. 2009. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. Trends in Food Science & Technology, 20(8), 344-354.
- Darılmaz, Ö. 2010. D., Geleneksel Türk peynirlerinde propiyonik asit bakteri türlerinin belirlenmesi ve bazı probiyotik özelliklerinin araştırılması. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji, Ankara.
- Dias, F. S., Duarte, W. F., Santos, M. R. R. M., Ramos, E. M. ve Schwan, R. F. 2013. Screening of Lactobacillus isolated from pork sausages for potential probiotic use and evaluation of the microbiological safety of fermented products. Journal of food protection, 76(6), 991-998.
- Dinakar, P. ve Mistry, V. V. 1994. Growth and viability of Bifidobacterium bifidum in Cheddar cheese. Journal of dairy science, 77(10), 2854-2864.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F., Collins, J.K., 2001. In Vitro Selection Criteria for Probiotic Bacteria of Human Origin: Correlation with In Vivo Findings. Am. J. Clin. Nutr., 73: 386-92.
- Durlu-Özkaya, F., Alichanidis, E., Litopoulou-Tzanetaki, E. ve Tunail, N. 1999. Determination of biogenic amine content of Beyaz cheese and biogenic amine production ability of some lactic acid bacteria. Milchwissen, 54 (12): 680-682.
- Durlu-Özkaya, F., ve Gün, İ. 2007. Anadolu'da peynir kültürü. ICANAS, Uluslararası Asya ve Kuzey Afrika Çalışmaları Kongresi, 10(15), 485.
- Erem, F., Küçükçetin, A., Certel, M., 2013. Bacillus Türlerinin Probiyotik Olarak Değerlendirilmesi. Gıda, 38 (4): 247-254.
- Ertürkmen, P. ve Öner, Z. 2015. Beyaz peynir örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin başlatıcı (starter) kültür özelliklerinin biyokimyasal yöntemlerle belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 19(3), 9-16.

- Eugster, E., Fuchsmann, P., Schlichtherle-Cerny, H., Bütikofer, U., & Irmeler, S. 2019. Formation of alanine, α -aminobutyrate, acetate, and 2-butanol during cheese ripening by *Pediococcus acidilactici* FAM18098. *International Dairy Journal*, 96, 21-28.
- FAO/WHO, 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, London, Ontario.
- Feng, J., Wang, L., Zhou, L., Yang, X. ve Zhao, X. 2016. Using in vitro immunomodulatory properties of lactic acid bacteria for selection of probiotics against *Salmonella* infection in broiler chicks. 11(1), e0147630.
- Feng, P., Yang, J., Zhao, S., Ling, Z., Han, R., Wu, Y. ve Li, X. 2022. Human supplementation with *Pediococcus acidilactici* GR-1 decreases heavy metals levels through modifying the gut microbiota and metabolome. *NPJ biofilms and microbiomes*, 8(1), 63.
- Forde, A., & Fitzgerald, G. F. 2000. Biotechnological approaches to the understanding and improvement of mature cheese flavour. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(5), 484-489.
- Fox, P. F., Guinee, T. P. ve Cogan, T. M., 2017b. Factors that Affect Cheese the Quality of Cheese, In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Fourth Edition, McSweeney, P., Fox, P., Cotter, P. Everett, D. (eds.), Elsevier Ltd., Volume 1, Academic Press, the UK, 617-641.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M. ve McSweeney, P. L. 2017a. Factors that Affect Cheese Quality, In: *Fundamentals of cheese science*, Second Edition, Springer, 533-542, New York.
- Fox, P. F., O'Connor, T. P., McSweeney, P. L., Guinee, T. P., ve O'Brien, N. M. 1996. Cheese: physical, biochemical, and nutritional aspects. *Advances in food and nutrition research*, 39, 163–328.
- Fröhlich-Wyder, M. T., ve Bachmann, H. P. 2004. Cheeses with propionic acid fermentation. In *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, Vol. 2, Elsevier Ltd., 142-156, London.
- Gardiner, G., Stanton, C., Lynch, P. B., Collins, J. K., Fitzgerald, G. ve Ross, R. P. 1999. Evaluation of cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. *Journal of dairy science*, 82(7), 1379-1387.
- Ghazanfar, S. ve Arif, I. 2019. Isolation and identification of probiotic to improve nutritional value of diet supplements. *Health*, 3, 139-143.
- Gomes, A. M. ve Malcata, F. X. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in food science & technology*, 10(4-5), 139-157.

- Gu, M., Werlinger, P., Cho, J. H., Jang, N., Choi, S. S., Suh, J. W. ve Cheng, J. 2022. *Lactobacillus Pentosus* MJM60383 Inhibits Lipid Accumulation in *Caenorhabditis elegans* Induced by *Enterobacter Cloacae* and Glucose. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 280.
- Gupta, V. ve Garg, R. 2009. Probiotics. *Indian journal of medical microbiology*, 27(3), 202–209.
- Gupta, A. ve Sharma, N. 2017. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria- *Pediococcus acidilactici* Ch-2 isolated from Chuli-A traditional apricot product of Himalayan region for the production of novel bioactive compounds with special therapeutic properties. *J food microbiol saf hyg*, 2(1), 1-11.
- Gürsoy, O. ve Kınık, Ö. 2006. Peynir Üretiminde Probiyotik Bakterilerin Kullanımı: Probiyotik Peynir. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 12(1), 105-116.
- Hai, D., Kong, L. Y., Lu, Z. X., Huang, X. Q. ve Bie, X. M. 2021. Inhibitory effect of different chicken-derived lactic acid bacteria isolates on drug resistant *Salmonella* SE47 isolated from eggs. *Letters in Applied Microbiology*, 73(1), 54-63.
- Hamed, E. 2021. Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria as probiotic. *Annals of Agricultural Science, Moshtohor*, 59(5), 311-322.
- Handley, P. S., Harty, D. W., Wyatt, J. E., Brown, C. R., Doran, J. P. ve Gibbs, A. C. 1987. A comparison of the adhesion, coaggregation and cell-surface hydrophobicity properties of fibrillar and fimbriate strains of *Streptococcus salivarius*. *Journal of general microbiology*, 133(11), 3207-3217.
- Harrigan, W. F. 1998. *Laboratory methods in food microbiology*, Third edition. Gulf professional publishing. San Diego: Academic Press.
- Hassanzadazar, H., Mardani, K., Yousefi, M. ve Ehsani, A. 2017. Identification and molecular characterisation of lactobacilli isolated from traditional Koopeh cheese. *International journal of dairy technology*, 70(4), 556-561.
- Hayaloglu, A. A. 2016. *Cheese: Microbiology of Cheese*. Reference module in food sciences. Elsevier Ltd., 1-11, Amsterdam.
- Henning, D. R., Baer, R. J., Hassan, A. N. ve Dave, R. 2006. Major advances in concentrated and dry milk products, cheese, and milk fat-based spreads. *Journal of Dairy Science*, 89(4), 1179-1188.
- Heo, S., Lee, J. H. ve Jeong, D. W. 2020. Food-derived coagulase-negative *Staphylococcus* as starter cultures for fermented foods. *Food science and biotechnology*, 29, 1023-1035.

- Hernandez D., Carrdell, E. ve Zarate, V. 2005. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal of Applied Microbiology*, 99; 77–84.
- Hevia, A., Martínez, N., Ladero, V., Álvarez, M. A., Margolles, A. ve Sánchez, B. 2013. An extracellular Serine/Threonine-rich protein from *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 is a novel aggregation-promoting factor with affinity to mucin. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(19), 6059-6066.
- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. ve Schillinger, U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 365-373.
- Jankowska, A., Laubitz, D., Antushevich, H., Zabielski, R. ve Grzesiuk, E. 2008. Competition of *Lactobacillus paracasei* with *Salmonella enterica* for adhesion to Caco-2 cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.
- Jayamanne, V. S. ve Adams, M. R. 2006. Determination of survival, identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio-yoghurts. *Letters in applied microbiology*, 42(3), 189-194.
- Joosten, H. M. L. J. ve Northolt, M. D. 1989. Detection, growth, and amine-producing capacity of lactobacilli in cheese. *Applied and environmental microbiology*, 55(9), 2356-2359.
- Kandil, S., & El Soda, M. 2015. Influence of freezing and freeze drying on intracellular enzymatic activity and autolytic properties of some lactic acid bacterial strains. *Advances in Microbiology*, 5(6), 371-382.
- Kang, C. H., Han, S. H., Kim, J. S., Kim, Y., Jeong, Y., Park, H. M. ve Paek, N. S. 2019. Inhibition of nitric oxide production, oxidative stress prevention, and probiotic activity of lactic acid bacteria isolated from the human vagina and fermented food. *Microorganisms*, 7(4), 109.
- Kechagia M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., Fakiri, E.M., 2013. Health Benefits of Probiotics: A Review. *ISRN Nutr.*, 481651: 1-7.
- König, H., ve Fröhlich, J. 2009. Chapter 1: Lactic Acid Bacteria, In: *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. König H., Uden, G. ve Fröhlich, J. (eds.), Springer, 3-29, Heidelberg.
- Lahtinen, S., Ouwehand, A. C., Salminen, S. ve von Wright, A. (eds.). 2011. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*, Crc Press. Boca Raton, FL, USA.
- Leroy, F. ve De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78.

- Lilly, D. M., ve Stillwell, R. H. 1965. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science*, 147(3659), 747–748.
- Lombogia, C. A., Tulung, M., Posangi, J. ve Tallei, T. E. 2020. Bacterial composition, community structure, and diversity in *Apis nigrocincta* gut. *International Journal of Microbiology*, 2020(1), 6906921.
- Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. ve Tsakalidou, E. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16(3), 189-199.
- Marino, M., Maifreni, M., Bartolomeoli, I. ve Rondinini, G. 2008. Evaluation of amino acid-decarboxylative microbiota throughout the ripening of an Italian PDO cheese produced using different manufacturing practices. *Journal of Applied Microbiology*, 105(2), 540-549.
- Mayo, B., Rodríguez, J., Vázquez, L. ve Flórez, A. B. 2021. Microbial interactions within the cheese ecosystem and their application to improve quality and safety. *Foods*, 10(3), 602.
- Murtaza, M. A., Ur-Rehman, S., Anjum, F. M., Huma, N., & Hafiz, I. 2014. Cheddar cheese ripening and flavor characterization: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(10), 1309-1321.
- Özden A. 2006. 1908 Nobel Tıp Ödülü, *Güncel Gastroenteroloji*, 273-278, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara.
- Park, H. A., Seo, H., Kim, S., Haq, A. U., Bae, S. H., Lee, H. J. ve Song, H. Y. 2024. Clinical effect of *Pediococcus acidilactici* PMC48 on hyperpigmented skin. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 23(1), 215-226.
- Phelan, J. A., Renaud, J., ve Fox, P. F. 1993. Some non-European cheese varieties. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Volume 2 Major Cheese Groups*, 421-465.
- Pino, A., Liotta, L., Randazzo, C. L., Todaro, A., Mazzaglia, A., De Nardo, F., et al. 2018. Polyphasic approach to study physico-chemical, microbiological and sensorial characteristics of artisanal Nicastrese goat's cheese. *Food Microbiol.* 70, 143–154.
- Plessas, S., Bosnea, L., Alexopoulos, A., & Bezirtzoglou, E. 2012. Potential effects of probiotics in cheese and yogurt production: A review. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 433-440.
- Rakhmanova, A., Khan, Z. A. ve Shah, K. 2018. A mini review fermentation and preservation: role of lactic acid bacteria. *MOJ Food Process Technol*, 6(5), 414-417.

- Reid, G., ve Bocking, A. 2003. The potential for probiotics to prevent bacterial vaginosis and preterm labor. *American journal of obstetrics and gynecology*, 189(4), 1202-1208.
- Ringø, E., Hoseinifar, S. H., Ghosh, K., Doan, H. V., Beck, B. R. ve Song, S. K. 2018. Lactic acid bacteria in finfish—An update. *Frontiers in microbiology*, 9, 376234.
- Rohr, M. W., Narasimhulu, C. A., Rudeski-Rohr, T. A. ve Parthasarathy, S. 2020. Negative effects of a high-fat diet on intestinal permeability: a review. *Advances in Nutrition*, 11(1), 77-91.
- Ross, R. P., Fitzgerald, G., Collins, K. ve Stanton, C. 2002. Cheese delivering biocultures-probiotic cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57(2), 71.
- Settanni, L. ve Moschetti, G. 2010. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food microbiology*, 27(6), 691-697.
- Shah, N. P., Lankaputhra, W. E., Britz, M. L. ve Kyle, W. S. 1995. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. *International dairy journal*, 5(5), 515-521.
- Sharma, S. ve Kanwar, S. 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, 3504-3511.
- Shao, Y., Wu, X., Yu, Z., Li, M., Sheng, T., Wang, Z. ve Qi, K. 2023. Gut Microbiome Analysis and Screening of Lactic Acid Bacteria with Probiotic Potential in Anhui Swine. *Animals*, 13(24), 3812.
- Silva, E. O. O. E., Nespolo, C. R., Sehn, C. P., Pinheiro, F. C. ve Stefani, L. M. 2019. Lactic acid bacteria with antimicrobial, proteolytic and lipolytic activities isolated from ovine dairy products. *Food Science and Technology*, 40(Suppl. 1), 293-299.
- Soggiu, A., Piras, C., Mortera, S. L., Alloggio, I., Urbani, A., Bonizzi, L., vd. 2016. Unravelling the effect of clostridia spores and lysozyme on microbiota dynamics in grana Padano cheese: a metaproteomics approach. *J. Proteome* 147, 21–27.
- Steele, J. L., ve Ünlü, G. 1992. Impact of lactic acid bacteria on cheese flavor development.
- Strobel, H. J. 2009. Basic laboratory culture methods for anaerobic bacteria. *Biofuels: Methods and Protocols*, 247-261.
- Talwalkar, A., Miller, C. W., Kailasapathy, K. ve Nguyen, M. H. 2004. Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. *International journal of food science & technology*, 39(6), 605-611.

- Teuber, M. 1993. Lactic acid bacteria. *Biotechnology: Biological Fundamentals*, 1, 325-366.
- Todorov, S. D., Dioso, C. M., Liong, M. T., Nero, L. A., Khosravi-Darani, K. ve Ivanova, I. V. 2023. Beneficial features of *pediococcus*: from starter cultures and inhibitory activities to probiotic benefits. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(1), 4.
- Uymaz, B., 2010. Probiyotikler ve Kullanım Alanları. *Pamukkale Üniv. Mühendislik Bilimleri Derg.*, 16 (1): 95-104.
- Vandevoorde, L., Christiaens, H., ve Verstraete, W. 1992. Prevalence of coaggregation reactions among chicken lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 72(3), 214-219.
- 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. *Food Research International*, 36; 895-904.
- Visciano, P. ve Schirone, M. 2022. Update on biogenic amines in fermented and non-fermented beverages. *Foods*, 11(3), 353.
- Voidarou, C., Antoniadou, M., Rozos, G., Tzora, A., Skoufos, I., Varzakas, T. ve Bezirtzoglou, E. 2020. Fermentative foods: Microbiology, biochemistry, potential human health benefits and public health issues. *Foods*, 10(1), 69.
- Walther, B., Schmid, A., Sieber, R., ve Wehrmüller, K. 2008. Cheese in nutrition and health. *Dairy Science and Technology*, 88(4-5), 389-405.
- Wang, C., Wang, H., Zhao, Z., Xiao, S., Zhao, Y., Duan, C. ve Wang, J. 2019. *Pediococcus acidilactici* AS185 attenuates early atherosclerosis development through inhibition of lipid regulation and inflammation in rats. *Journal of Functional Foods*, 60, 103424.
- Wedajo, B. 2015. Lactic acid bacteria: benefits, selection criteria and probiotic potential in fermented food. *Journal of Probiotics & Health*, 3(02).
- Yakoob, R. ve Pradeep, B. V. 2019. *Bifidobacterium* sp as Probiotic agent-roles and applications. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 13(3).
- Yörük, G. ve Güner, A. 2011. Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması ve *Weissella* türlerinin gıda mikrobiyolojisinde önemi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 6(2), 163-176.
- Zhang, Q., Guo, W. L., Chen, G. M., Qian, M., Han, J. Z., Lv, X. C. ve Ni, L. 2022. *Pediococcus acidilactici* FZU106 alleviates high-fat diet-induced lipid metabolism disorder in association with the modulation of intestinal microbiota in hyperlipidemic rats. *Current Research in Food Science*, 5, 775-788.

EKLER

EK 1 DİZİ ANALİZ SONUÇLARI

AS26 izolatının 16S rDNA dizi analizi sonucu tanısı

RID: [6SUD6U23013](#) Search expires on 06-16 00:02 am [Download All](#) ▼

Program: BLASTN [Citation](#) ▼

Database: nt [See details](#) ▼

Query ID: lcl|Query_1284529

Description: None

Molecule type: dna

Query Length: 963

Other reports: [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) [?](#)

Organism: only top 20 will appear ☐ exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity: to E value: to Query Coverage: to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download ▼ Select columns ▼ Show 100 ▼ [?](#)

☒ select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒ Pediococcus acidilactici strain PCNKBS 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus acidilactici	1253	1253	80%	0.0	95.36%	1472	MH752471.1
☒ Pediococcus acidilactici strain HN9 chromosome, complete genome	Pediococcus acidilactici	1249	6228	80%	0.0	95.36%	2034522	CP061715.1
☒ Pediococcus acidilactici strain MT25 chromosome, complete genome	Pediococcus acidilactici	1245	6223	80%	0.0	95.23%	1869541	CP083725.1
☒ Pediococcus acidilactici strain FDAARGOS_1008 chromosome, complete genome	Pediococcus acidilactici	1245	6219	80%	0.0	95.23%	2009583	CP066066.1
☒ Pediococcus acidilactici strain FDAARGOS_1007 chromosome, complete genome	Pediococcus acidilactici	1245	6225	80%	0.0	95.23%	2068296	CP066046.1
☒ Pediococcus acidilactici gene for 16S rRNA, partial sequence, strain Ni1001	Pediococcus acidilactici	1245	1245	80%	0.0	95.23%	1538	AB598949.1
☒ Pediococcus pentosaceus strain HM75-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus pentosaceus	1243	1243	80%	0.0	95.23%	1427	MT645305.1
☒ Pediococcus acidilactici strain 2234 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus acidilactici	1243	1243	80%	0.0	95.23%	1486	MT604720.1

AS32 izolatının 16S rDNA dizi analizi sonucu tanısı

RID: [6S3C4C9J016](#) Search expires on 06-15 17:29 pm [Download All](#) ▼

Program: BLASTN [Citation](#) ▼

Database: nt [See details](#) ▼

Query ID: lcl|Query_1606479

Description: None

Molecule type: dna

Query Length: 949

Other reports: [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) [?](#)

Organism: only top 20 will appear ☐ exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity: to E value: to Query Coverage: to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download ▼ Select columns ▼ Show 100 ▼ [?](#)

☒ select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒ Pediococcus acidilactici strain lolli FS10 chromosome	Pediococcus aci...	1628	8119	95%	0.0	99.01%	1961433	CP109913.1
☒ Pediococcus acidilactici strain A1602 chromosome, complete genome	Pediococcus aci...	1626	8130	95%	0.0	99.22%	1912403	CP129528.1
☒ Pediococcus lolli strain C366 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus aci...	1626	1626	95%	0.0	98.90%	1525	KJ580428.1
☒ Pediococcus acidilactici strain BA28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus aci...	1626	1626	95%	0.0	98.90%	1462	JX431046.1
☒ Pediococcus acidilactici gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 12231	Pediococcus aci...	1626	1626	95%	0.0	98.90%	1502	AB680266.1
☒ Pediococcus acidilactici strain UL5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus aci...	1626	1626	95%	0.0	98.90%	1568	EF059987.1
☒ Pediococcus acidilactici strain UVA1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus aci...	1626	1626	95%	0.0	98.90%	1492	EF059986.1
☒ Pediococcus acidilactici strain 8613 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus aci...	1624	1624	95%	0.0	98.69%	1488	MT464372.1

AS40 izolatının 16S rDNA dizi analizi sonucu tanısı

RID [6SVB6URR013](#) Search expires on 06-16 00:18 am [Download All](#) ▼

Program BLASTN [Citation](#) ▼

Database nt [See details](#) ▼

Query ID lcl|Query_2328669

Description None

Molecule type dna

Query Length 960

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) [?](#)

Organism only top 20 will appear ☐ exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download ▼ Select columns ▼ Show 100 ▼ [?](#)

☒ select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒ Pediococcus acidilactici strain A1602 chromosome, complete genome	Pediococcus aci...	1602	8010	94%	0.0	98.23%	1912403	CP129528.1
☒ Pediococcus acidilactici strain lolii FS10 chromosome	Pediococcus aci...	1602	7997	94%	0.0	98.23%	1961433	CP109913.1
☒ Pediococcus lolii strain C.J66 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus aci...	1602	1602	94%	0.0	98.23%	1525	KJ580428.1
☒ Pediococcus acidilactici strain BA28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus aci...	1602	1602	94%	0.0	98.23%	1462	JX431046.1
☒ Pediococcus acidilactici gene for 16S rRNA, partial sequence, strain NBRC 12231	Pediococcus aci...	1602	1602	94%	0.0	98.23%	1502	AB680266.1
☒ Pediococcus acidilactici strain UL5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus aci...	1602	1602	94%	0.0	98.23%	1568	EF050987.1
☒ Pediococcus acidilactici strain UVA1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus aci...	1602	1602	94%	0.0	98.23%	1492	EF050986.1
☒ Pediococcus acidilactici strain GC215 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus aci...	1598	1598	93%	0.0	98.33%	1481	OR793164.1

AS53 izolatının 16S rDNA dizi analizi sonucu tanısı

RID [6SVUM5NW013](#) Search expires on 06-16 00:27 am [Download All](#) ▼

Program BLASTN [Citation](#) ▼

Database nt [See details](#) ▼

Query ID lcl|Query_5339493

Description None

Molecule type dna

Query Length 954

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) [?](#)

Organism only top 20 will appear ☐ exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download ▼ Select columns ▼ Show 100 ▼ [?](#)

☒ select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒ Pediococcus acidilactici strain GC215 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus aci...	1640	1640	94%	0.0	99.55%	1481	OR793164.1
☒ Pediococcus acidilactici strain HDM5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus aci...	1637	1637	94%	0.0	99.33%	1481	OR485709.1
☒ Pediococcus acidilactici strain A1602 chromosome, complete genome	Pediococcus aci...	1633	8167	94%	0.0	99.22%	1912403	CP129528.1
☒ Pediococcus acidilactici strain lolii FS10 chromosome	Pediococcus aci...	1633	8147	94%	0.0	99.22%	1961433	CP109913.1
☒ Pediococcus lolii strain C.J66 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus aci...	1633	1633	94%	0.0	99.22%	1525	KJ580428.1
☒ Pediococcus acidilactici strain BA28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus aci...	1633	1633	94%	0.0	99.22%	1462	JX431046.1
☒ Pediococcus acidilactici gene for 16S rRNA, partial sequence, strain NBRC 12231	Pediococcus aci...	1633	1633	94%	0.0	99.22%	1502	AB680266.1
☒ Pediococcus acidilactici strain UL5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus aci...	1633	1633	94%	0.0	99.22%	1568	EF050987.1

AS57 izolatının 16S rDNA dizi analizi sonucu tanısı

RID: [6SVZC4WJ013](#) Search expires on 06-16 00:29 am [Download All](#) ▼

Program: BLASTN [Citation](#) ▼

Database: nt [See details](#) ▼

Query ID: lcl|Query_3063421

Description: None

Molecule type: dna

Query Length: 954

Other reports: [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) ?

Organism only top 20 will appear ☐ exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity: to E value: to Query Coverage: to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download ▼ Select columns ▼ Show 100 ▼ ?

☒ select all 100 sequences selected

[GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
☒ Pediococcus acidilactici strain G1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus aci...	1652	1652	95%	0.0	99.01%	1482	KT895267.1
☒ Pediococcus acidilactici strain A1602 chromosome, complete genome	Pediococcus aci...	1650	8250	95%	0.0	99.01%	1912403	CP129528.1
☒ Pediococcus acidilactici strain loli FS10 chromosome	Pediococcus aci...	1650	8228	95%	0.0	99.01%	1961433	CP109913.1
☒ Pediococcus loli strain CJ66 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus aci...	1650	1650	95%	0.0	99.01%	1525	KJ580428.1
☒ Pediococcus acidilactici strain BA28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus aci...	1650	1650	95%	0.0	99.01%	1462	JX431046.1
☒ Pediococcus acidilactici gene for 16S rRNA, partial sequence, strain NBRC 12231	Pediococcus aci...	1650	1650	95%	0.0	99.01%	1502	AB680266.1
☒ Pediococcus acidilactici strain UL5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus aci...	1650	1650	95%	0.0	99.01%	1568	EF059987.1
☒ Pediococcus acidilactici strain UVA1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus aci...	1650	1650	95%	0.0	99.01%	1492	EF059986.1

AS66 izolatının 16S rDNA dizi analizi sonucu tanısı

RID: [6SW8P9PJ013](#) Search expires on 06-16 00:34 am [Download All](#) ▼

Program: BLASTN [Citation](#) ▼

Database: nt [See details](#) ▼

Query ID: lcl|Query_5640221

Description: None

Molecule type: dna

Query Length: 951

Other reports: [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) ?

Organism only top 20 will appear ☐ exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity: to E value: to Query Coverage: to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download ▼ Select columns ▼ Show 100 ▼ ?

☒ select all 100 sequences selected

[GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
☒ Pediococcus acidilactici strain A1602 chromosome, complete genome	Pediococcus aci...	1609	8047	95%	0.0	98.25%	1912403	CP129528.1
☒ Pediococcus acidilactici strain G1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus aci...	1609	1609	95%	0.0	98.25%	1482	KT895267.1
☒ Pediococcus acidilactici strain loli FS10 chromosome	Pediococcus aci...	1609	8029	95%	0.0	98.25%	1961433	CP109913.1
☒ Pediococcus loli strain CJ66 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus aci...	1609	1609	95%	0.0	98.25%	1525	KJ580428.1
☒ Pediococcus acidilactici strain BA28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus aci...	1609	1609	95%	0.0	98.25%	1462	JX431046.1
☒ Pediococcus acidilactici gene for 16S rRNA, partial sequence, strain NBRC 12231	Pediococcus aci...	1609	1609	95%	0.0	98.25%	1502	AB680266.1
☒ Pediococcus acidilactici strain UL5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus aci...	1609	1609	95%	0.0	98.25%	1568	EF059987.1
☒ Pediococcus acidilactici strain UVA1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pediococcus aci...	1609	1609	95%	0.0	98.25%	1492	EF059986.1

EK 2 %CANLILIK DÜZEYLERİ

İzolatların düşük pH'a direnç % canlılık düzeyleri

AS26	0.saat	1.saat	2.saat	3.saat
pH 1	≥100	≥100	≥100	≥100
pH 2	≥100	≥100	≥100	≥100
pH 3	96,89	≥100	98,2	≥100

AS32	0.saat	1.saat	2.saat	3.saat
pH 1	≥100	88,64	85,79	≥100
pH 2	94,32	≥100	96,78	≥100
pH 3	≥100	97,64	94,5	97,64

AS40	0.saat	1.saat	2.saat	3.saat
pH 1	-	96,58	98,96	97,77
pH 2	-	≥100	98,96	≥100
pH 3	-	81,86	96,36	≥100

AS53	0.saat	1.saat	2.saat	3.saat
pH 1	94,32	≥100	93,98	≥100
pH 2	≥100	83,45	≥100	90,78
pH 3	0	73,97	93,98	90,78

AS57	0.saat	1.saat	2.saat	3.saat
pH 1	≥100	≥100	≥100	≥100
pH 2	≥100	≥100	≥100	≥100
pH 3	≥100	≥100	≥100	96,89

AS66	0.saat	1.saat	2.saat	3.saat
pH 1	92,35	92,35	92,86	92,4
pH 2	96,72	93,7	98,75	≥100
pH 3	98,85	≥100	≥100	≥100

İzolatların pepsine direnç %canlılık düzeyleri

AS26	0.saat	1.saat	3.saat
pH 2	≥100	98,21	96,54
pH 3	≥100	98,21	99,53

AS32	0.saat	1.saat	3.saat
pH 2	87,05	≥100	≥100
pH 3	87,05	≥100	≥100

AS40	0.saat	1.saat	3.saat
pH 2	≥100	≥100	90,19
pH 3	96,6	≥100	93,36

AS53	0.saat	1.saat	3.saat
pH 2	98,2	97,25	93,77
pH 3	95,89	89,04	95,48

AS57	0.saat	1.saat	3.saat
pH 2	≥100	99,1	≥100
pH 3	93,36	98,07	93,77

AS66	0.saat	1.saat	3.saat
pH 2	96,6	98,2	95,89
pH 3	≥100	98,2	98,2

İzolatların pankreatine direnç %canlılık düzeyleri

	0.saat	4.saat
AS26-pankreatinli	97,59	93,42

	0.saat	4.saat
AS32-pankreatinli	≥100	≥100

	0.saat	4.saat
AS40-pankreatinli	≥100	≥100

	0.saat	4.saat
AS53-pankreatinli	96,82	99,4

	0.saat	4.saat
AS57-pankreatinli	98,21	≥100

	0.saat	4.saat
AS66-pankreatinli	≥100	98,94

İzolatların safra tuzuna direnç %canlılık düzeyleri

AS26	0.saat	4.saat
0,3%	-	≥100
0,5%	-	≥100
1%	-	≥100

AS32	0.saat	4.saat
0,3%	94,32	96,36
0,5%	94,32	98,96
1%	≥100	≥100

AS40	0.saat	4.saat
0,3%	99,2	93,69
0,5%	97,28	93,13
1%	99,2	97,38

AS53	0.saat	4.saat
0,3%	≥100	-
0,5%	≥100	-
1%	≥100	-

AS57	0.saat	4.saat
0,3%	≥100	≥100
0,5%	≥100	96,6
1%	96,6	0

AS66	0.saat	4.saat
0,3%	≥100	≥100
0,5%	≥100	≥100
1%	93,98	93,98