

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAZI *ENTEROCOCCUS LACTOCOCCUS* VE *PEDIOCOCCUS*
BAKTERİLERİNİN PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Maimaiti AKEPAER

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2015**

Her hakkı saklıdır

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

16.01.2015

Maimaiti AKEPAER

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI *ENTEROCOCCUS LACTOCOCCUS* VE *PEDIOCOCCUS* BAKTERİLERİNİN PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Maimaiti AKEPAER

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU
Eş Danışman: Prof. Dr. Yavuz BEYATLI

Bu çalışmada 10 adet gıda kaynaklı (*Enterococcus durans* 51, *Ent. faecalis* 79, *Ent. faecium* 03, *Lactococcus lactis* subsp.*Lactis* 35, *Lac. lactis* subsp.*Lactis* 99, *Lac. lactis* subsp.*Lactis* 33, *Lac. lactis* subsp.*Lactis* 102, *Pediococcus acidilactici* DT9, *Ped. pentosaceus* P19, *Ped. pentosaceus* C24) laktik asit bakterilerinin bazı probiyotik özellikleri araştırılmıştır. Bakterilerin (ekzopolisakkarit (EPS) üretimleri, farklı besiyerlerinde yüzde asit üretimleri, antibiyotiklere karşı duyarlılıkları, antimikrobiyal aktivite, agregasyon (otoagregasyon ve koagregasyon) yetenekleri, farklı pH ve safra konsantrasyonlarına karşı toleranslılıkları belirlenmiştir). Elde edilen araştırma bulguları İstatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Suşların, EPS üretim miktarları fenol sülfürik asit metodu ile spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir. Suşların EPS üretim miktarları 127,30–245,00 mg/l arasında değişiklik göstermiştir. Kültürlerin yüzde asit üretim miktarları TGE ve Skim Milk besiortamlarında titrasyon yöntemi ile belirlenmiştir. Suşların TGE besiortamında %1.05-1.34, Skim Milk besiortamında %0.99-1.42 oranlarında asit üretikleri bulunmuştur. LAB suşlarının (Gentamisin (CN), Nitrofurantoin (F), Penisilin (P), Polimiksin (PB), Ofloksasin (OFX)) antibiyotiklere karşı duyarlılıkları araştırılmış ve elde edilen sonuçlar CLSI standardına göre değerlendirilmiştir. Tüm suşların Ofloksasin ve Polimiksin antibiyotiklerine karşı dirençli oldukları belirlenmiştir. Suşların diğer antibiyotiklere karşı duyarlılıkları farklılık göstermiştir. LAB suşlarının bazı patojen (*E. coli* ATCC 11229, *E. coli* O157:H7, *B. Cereus* RSKK 863, *S. enteritidis* ATCC 13076, *S. aureus* ATCC 25923 ve *L. Monocytogenes* ATCC 7644) suşları üzerinde antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yönetmi ile araştırılmış, suşların antimikrobiyal etkinliklerinin suşa göre değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. LAB suşlarının otoagregasyon yetenekleri spektrofotometrik yöntemle araştırılmış ve otoagregasyon oranlarının (%23,0-%34,0) arasında bulunmuştur. LAB suşlarının *E. coli* ATCC 11229 ile koagregasyonları spektrofotometrik yöntemle çalışılmış ve koagregasyon oranlarının (%1,92-%27,3) arasında bulunmuştur. LAB suşlarının farklı (pH, 2,3,4,5) değerlerinde yüzde canlılıkları spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Suşların, bu farklı pH değerlerinde %canlılıkları sırası ile; (%0,05-%3,81) (%1,88-%13,42), (%21,87-%89,49) ve (%91,16-%98,94) arasında bulunmuştur. LAB suşların (%0,06, %0.15 ve %0.30) safra konsantrasyonunda %canlılıkları sırasıile, (%92,03 - %99), (15, %78,36 - %90,53) ve (%67,52 - %74,65) arasında bulunmuştur.

Ocak 2015, 71 sayfa

Anahtar Kelimeler: LAB bakteriler, EPS üretimi, asit üretimi, antibiyotik duyarlık, antimikrobiyal aktivite, asit ve safra dirençliliği, otoagregasyon, koagregasyon.

ABSTRACT

Master Thesis

STUDING OF SOME PROBIOTIC PROPERTIES OF *ENTEROCOCCUS LACTOCOCCUS* AND *PEDIOCOCCUS BACTERIA*.

Maimaiti AKEPAER

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

Supervisor: Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU
Co-Supervisor: Prof. Dr. Yavuz BEYATLI

In this study, 10 food borne LAB bacteria (*Enterococcus durans* 51, *Ent. faecalis* 79, *Ent. faecium* 03, *Lactococcus lactis* subsp.*Lactis* 35, *Lac. lactis* subsp.*Lactis* 99, *Lac. lactis* subsp.*Lactis* 33, *Lac. lactis* subsp.*Lactis* 102, *Pediococcus acidilactici* DT9, *Ped. pentosaceus* P19, *Ped. pentosaceus* C24) were screened for their some probiotic properties (exopolysaccharide (EPS) production, acid production in different medium, sensitivity to antibiotics, antimicrobial activity, aggregation, resistance to acid and bile tolerance). The research findings were evaluated statistically. Spectrophotometrically, phenol sulfuric acid method were used to determine EPS production by the strains. The EPS production by the strains were ranged between (127,30–245,00) mg/L. The amount of total acid production by the strains in TGE and Skim Milk medium were ranged between (%1.05-1.34) and (%0.99-1.42), respectively. Disc diffusion method has been used to determine the sensitivity of the strains to (Gentamisin (CN), Nitrofurantoin (F), Penisilin (P), Polimiksin (PB), Ofloksasin (OFX) antibiotics. All the strains were determined to be resistant to Ofloksasin and Polimiksin antibiotics. Also, stanins showed differences susceptibility to other antibiotics. Disc Diffusion method were used for studying antimicrobial activity of LAB strains over the pathogenic bacteria LAB suşlarının bazı patojen (*E. coli* ATCC 11229, *E. coli* O157:H7, *B. Cereus* RSKK 863, *S. enteritidis* ATCC 13076, *S. aureus* ATCC 25923 ve *L. Monocytogenes* ATCC 7644). It was determined that the antimicrobial activity of the strains were varied and depending on the strain. The spectrophotometric method were used for estimation of autoaggregation and coaggregation of the strains. The otoagregasyon of the strains were ranged between (%23,0-%34,0). Strains were coaggregated with *E. coli* ATCC 11229 by (%1,92-%27,3). LAB strains were grown in different pH values (2,3,4,5) and the percentage of total living cells were estimated by spectrophotometric method. The percentage of living cells were (%0,05-%3,81), (%1,88-%13,42), (%21,87-%89,49) and (%91,16-%98,94), respectively. Tolerances and the percentage living cells of the strains in different (%0,06, %0.15, %0.30) bile salt concentration were estimated as (%92,03 - %99), (15, %78,36 - %90,53) and (%67,52 - %74,65), respectively.

January 2015, 71 pages

Key Words: LAB bacteria, EPS production, acid production, resistances to antibiotics, antimicrobial activity, resistance to acid and bile tolerance, otoaggregation, coaggregation.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca değerli ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, tecrübe ve eşsiz bilgilerinden yararlandığım sayın hocam Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU ve Eş Danışmanım Prof. Dr. Yavuz BEYATLI'ya sonsuz teşekkür ederim. Deneysel çalışmalarımın yürütüldüğü Gazi Üniversitesi, Biyoloji bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarı çalışanlarına, maddi ve manevi destekleriyle hayatım boyunca yanımda olan annem ve babama, bana her zaman destek veren kardeşim'e, beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, tüm sıkıntılarımı paylaşan eşim'e ve canım oğullarım HAMZA ve MUHSİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Maimaiti AKEPAER

Ankara, Ocak 2015

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1 Probiyotikler	3
2.1.1 Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar	4
2.1.2 Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalarda Aranan Özellikler	5
2.1.3 Probiyotik Mikroorganizmaların Etki Mekanizmaları ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri	7
2.2 Laktik Asit Bakterileri.....	8
2.2.1 <i>Pediococcus</i> Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri.....	10
2.2.2 <i>Enterococcus</i> Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri	11
2.2.3 <i>Lactococcus</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	13
2.3 Laktik Asit Üretimi	15
2.4 Antimikrobiyal Aktiviteleri.....	16
2.5 Antibiyotiğe Direnç	19
2.6 Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi ve Probiyotik Önemi	21
2.7 Agregasyon, Otoagregasyon ve Koagregasyon Özellikleri	25
2.8 Bakterilerin Farklı PH Değerlerine Toleransının Belirlenmesi	27
2.9 Suşların Farklı Safra Konsantrasyonlarına Toleransının Belirlenmesi	28
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	30
3.1 Materyal	30
3.1.1 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler	30
3.1.2 Bakterilerin Muhafazası.....	32
3.1.3 Araştırmada Kullanılan Test Bakterileri	32
3.2 Metotlar.....	33
3.2.1 LAB bakterilerin Aktifleştirilmesi ve Gelişme Ortamları	33
3.2.2 Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi	33
3.2.3 Kültürlerin Farklı Besiyerlerindeki pH ve Yüzde Asit Üretimlerinin Belirlenmesi.	34
3.2.4 Antibiyotik Duyarlılık.....	34
3.2.5 Antimikrobiyal Aktivite.....	35
3.2.6 Otoagregasyon	35
3.2.7 Koagregasyon	36
3.2.8 Farklı pH Değerlerine Toleransı	36
3.2.9 Farklı Safra Konsantrasyonlarına Toleransı	37
3.2.10 İstatistiksel Analizler	37
4. DENEYSEL BULGULARI	38

4.1 Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi	38
4.2 Kùltürlerin Farklı Besiyerlerindeki Yüzde Asit Üretimleri.....	39
4.3 LAB'ların Antibiyotik Duyarlılık.....	41
4.4 LAB'ların Antimikrobiyel Aktiviteleri	43
4.5 LAB Bakterilerin Otoagregasyon.....	44
4.6 LAB Bakterilerin Koagregasyonu.....	45
4.7 LAB Bakterilerin Farklı pH Değerlerine Toleransı	47
4.8 LAB Bakterilerin Farklı Safra Konsantrasyonlarına Toleransı	49
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	51
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ.....	71

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat derece
CO ₂	Karbondiyoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
L	Litre
M	Molar
ml	Mililitre
mg	Miligram
mm	Milimetre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
RNA	Ribonükleik Asit
Rpm	Dakikada Devir Sayısı
PH	Asitlik Bazlık Birimi
Spp	Species
Subsp	Subspecies (Alt Tür)
vb	Ve benzeri
vd	Ve diğerleri
%	Yüzde

Kısaltmalar

ATCC	American Type Culture Collection
Dak	Dakika
Dev	Devir
EPS	Ekzopolisakkarit
HCl	Hidrojen klorür
HePS	Heteropolysaccharide
IgA	İmmünglobulin A
LAB	Laktik Asit Bakterileri
MRS	Man Rogosa Sharp besiyeri
OD	Optikal Dansite
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
RSSK	Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı Kültür Koleksiyonu
SHE	Serbest Hücre Ekstraktı
SM	Skim milk
TGE	Trypton, Glukoz, Maya Ekstraktı
TCA	Taurokolik as
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 <i>Pediococcus</i>	11
Şekil 2.2 <i>Enterococcus</i>	12
Şekil 2.3 <i>Lactococcus</i>	14
Şekil 4.1 LAB bakterilerin EPS üretim miktarlarının karşılaştırılması.	39
Şekil 4.2 LAB bakterilerin TGE ve SM besiyerlerinde ürettikleri yüzde asitliklerinin karşılaştırılması.	40
Şekil 4.3 Suşlarının antibiyotiklere karşı gösterdiği %duyarlılık ve dirençlilik oranları.	42
Şekil 4.4 LAB bakterilerin % Otoagregasyonları.	45
Şekil 4.5 LAB bakterilerin <i>E. Coli</i> ATCC 11229 ile % Koagregasyonları.	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar	5
Çizelge 2.2 Probiyotik seçiminde araştırılması gereken önemli kriterler	6
Çizelge 2.3 Probiyotiklerin sağlık üzerindeki olumlu etkileri aşağıda verilmektedir.....	8
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan bakteri tür adları ve kodları	30
Çizelge 3.2 MRS (Man Rogosa and Sharpe) Sıvı Besiortamı.	31
Çizelge 3.3 TGE (Trypton,Glukoz,Maya Ekstraktı) Sıvı Besiortamı.....	31
Çizelge 3.4 Nutrient Broth sıvı besiyeri.....	32
Çizelge 4.1 LAB bakterilerin ekzopolisakkarit üretimleri (mg/L).....	38
Çizelge 4.2 Bakterilerin TGE ve SM besiyerlerinde ürettikleri yüzde asitlik miktarları.	40
Çizelge 4.3 CLSI kriterlerine göre antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi.....	41
Çizelge 4.4 LAB suşların antibiyotik duyarlılıkları.	42
Çizelge 4.5 LAB bakterilerin test bakterileri üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çap değerleri (mm).....	44
Çizelge 4.6 LAB bakterilerin % otoagregasyonları.	45
Çizelge 4.7 LAB suşların <i>E. coli</i> ile % koagregasyonuları.....	46
Çizelge 4.8 LAB suşlarının farklı pH değerlerine toleransı ve regresyon analiz sonuçlar.....	48
Çizelge 4.9 LAB'ların farklı safra konsantrasyonlarına toleransı	50

RESİMLER DİZİNİ

Resim 4.1 <i>Ent. durans</i> 51 suşun Penisilin (P) 10 U karşı duyarlılığı.....	41
Resim 4.2 <i>Lac. lactis</i> 33'ün <i>E. coli</i> ATCC 11229 üzerinde antimikrobiyal etkisi.	43

1. GİRİŞ

Probiyotik insan ve hayvanlar için olumlu etkileri olan mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmalar intestinal mikrobiyal dengeyi katkı sağlayarak, sağlığı korumada önemli rolleri vardır. Probiyotik mikroorganizmalar çoğunlukla laktik asit bakteri (LAB) türlerinden oluşur. Ancak *Bacillus* ve bazı maya suşları da uygun adaylar olarak tespit edilmiştir. Probiotikler zararlı mikroorganizmalara karşı organizmanın korunmasında önemli bir rol oynayabilir ve aynı zamanda konağın bağışıklık sistemini güçlendirirler (Gueimonde 2006).

Lactococcus lactis laktik asit bakterisi olup, karbohidratları laktik aside dönüştürür. Bakteri hayvanların deri ve tüylerinde, gastrointestinal sistemde ve bitkilerde bulunur. Bakteri süt endüstrisinde peynir üretiminde starter olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, bakteri bira, şarap ve turşu üretiminde de kullanılmaktadır. *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* bakteri *Lactococcus lactis*'in bir alt türü olup, yumşak peynir üretiminde kullanılır. *Lactococcus lactis* kok veya oval şeklinde olup, besi yerlerinde çiftler ya da kısa zincirler halinde bulunurlar (Chung 1999).

Pediococcus bakteriler kok şeklinde olup ikili düzlemde tetrat şeklinde bölünmektedirler. Karbonhidrat fermentasyonu sonucunda sadece laktik asit ürettiğinden homofermantatiftir *Pediococcus* cinsi bakteriler 8 tür içermektedir (*Pediococcus acidilactici*; *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus damnosus* ve *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus cerevisia*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus damnosus* (Del 2000). Pediokoklar doğal olarak mandıra ürünlerine, etlerde, taze sebze, bira ve şarap gibi fermente ürünlerde bulunmaktadır. Bunlar doğal olarak sebze ve etlerin fermentasyonlarının kontrolüyle ilişkili olup, peynirin oluşmasında ikinci flora gibidir (Del 1998).

Enterococcus cinsi bakteriler her yerde bulunabilme özelliğine sahiptirler. Bu bakteriler insan ve hayvan bağırsaklarında normal floranın bir parçasıdır ve memelilerin gastrointestinal yolundaki bakterilerin büyük bir kısmını oluştururlar (Hugas vd. 2003). Yüksek sıcaklığa toleransları ve kötü çevresel koşullarda üreyebilmeleri nedeniyle

çeşitli ortamlarda kolonize olabilirler. Bu mikroorganizmalara dışkı, toprak, yüzey suları ve bitki materyallerinin yanı sıra et ve süt ürünleri gibi hayvansal gıdalarda oldukça sık rastlanır (Giraffa 2003). *Enterococcus* cinsi bakteriler çeşitli çevresel ortamlara olan toleransı, sıcaklık direnci ve ısıtma işlem görmüş gıdalarda mikrobiyal popülasyonları baskılamaları nedeniyle fekal kontaminasyonun belirlenmesi ve gıdalarda hijyen ve sanitasyonun kontrolü amacı ile indikatör mikroorganizmalar olarak kullanılmaktadır (Giraffa 2003) *Enterococcus* cinsi içinde probiyotik özellik gösteren iki tür *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* olarak bildirilmiştir (Sarantinopoulos vd. 2001). *Enterococcus faecium*'un insanlarda probiyotik etkisi ise kolesterolün sindirim sisteminden kana absorpsiyonunun azaltılması şeklindedir (Saaavedra vd. 2003). *Enterococcus* cinsi bakteriler özellikle süt ve et ürünlerinin doğal floralarının bir parçası olmaları nedeniyle, bu ürünlerin fermentasyonunda doğal starter kültürler arasında yer almaktadır (Saaavedra vd. 2003). Bu bakteriler çeşitli geleneksel fermente ürünlerin üretiminde faydalı rol oynayabilirler (Franz vd. 2003).

Probiyotik bakterilerin seçiminde bazı özel kriterlerden yararlanılmaktadır Bu kriterler: Güvenilir ve stabil olmalıdır, EPS üretebilmeli, Düşük pH ve safra tuzlarına karşı dayanıklı olmalıdır. Mide ve bağırsak kanalından geçişleri sırasında canlı kalabilmelidirler, Agregasyon ve koagregasyon yeteneğine sahip olmalıdır, Patojen bakterilere karşı antagonistik etkileri olmalıdır, Patojenik olmamalı ve toksik madde üretmemeli ve diğer faktörler (Huang 2004). Bu esas doğrultusunda planlanan yüksek lisans tez çalışmasında: *Lactococcus*, *Pediococcus* ve *Enterococcus* cinslerine dahil bakterilerin probiyotik özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Probiyotikler

Probiyotikler, insan ve hayvanların doğal mikroflorasına ait özellikleri geliştiren, tüketimleri sonucunda ağızda, sindirim sisteminde, üst solunum yollarında ya da ürogenital kanallarda yararlı etkileri ile konakçının sağlığını koruyan, buralarda oluşan enfeksiyonların iyileşmesine katkıda bulunan, tek veya karışık mikroorganizma kültürleridir (Darılmaz vd. 2012). “Probiyotik” terimi ilk olarak 1954 yılında Ferdinand Vergin tarafından antibiyotik ve flora üzerindeki diğer antimikrobiyal maddelerin patojen olmayan bakterilerin yararlı “Probiotika” etkileriyle ilişkisinin anlatıldığı “Anti-und Probiotika” isimli makalede kullanılmıştır (Corthier 2004). 1965 yılında, Lilly ve Stillwell araştırmacılar tarafından, diğer mikroorganizmaların gelişimini destekleyen maddeleri tanımlamak için de kullanılmıştır (Mercenier 2002). En çok kabul gören tanımları Roy Fuller tarafından 1989 yılında “tüketici sağlığına bireylerin intestinal mikrobiyal dengesini koruyarak veya geliştirerek yararlı olan canlı mikrobiyal gıda katkılarıdır” şeklinde yapılmıştır (Fuller 1989). Bu tanım 1998 yılında Salminen et al. (1998) tarafından “insan ve hayvanların sağlığını geliştirmek için tasarlanan gıda, yem ya da besinsel katkılardaki canlı mikrobiyal preparasyonlar” olarak değiştirilmiştir. Probiyotiklerin çoğunluğu patojen olmayan mikroorganizmalardır ve *Laktobasiller*, *Bifidobakteriler* ve Enterokoklar gibi insan sindirim sisteminde doğal olarak bulunmaktadırlar (Guslandi 2003).

Fermente gıdaların metabolizma üzerindeki faydalı etkileri ilk defa 20. yüzyılın başlarında Nobel ödül sahibi; Rus Bilim adamı Elie Metchnikoff tarafından öne sürülmüştür. Metchnikoff Bulgar çiftçilerin fermente süt ürünleri tüketimi sonucu daha sağlıklı ve uzun ömürlü olduklarını, bunun nedeninin ise bu ürünlerde bulunan çubuk şeklindeki bakterilerin (*Lactobacillus* spp.) bağırsaktaki mikroflorayı olumlu yönde etkilemesi ve toksik mikrobiyal aktiviteyi azaltması olduğunu belirtmiştir. Fermente ürünler üzerinde yapılan çalışmaların başlangıcı çok eskilere dayanmakla birlikte, probiyotikler konusunda yapılan çalışmalar ancak son 10–15 yılda hız kazanmıştır (Sanders 1999). Geleneksel olarak probiyotikler yoğurtla birleştirilmiştir ama son

yıllarda süt, ekşimiş süt, dondurma, peynir ve peynirden elde edilen ürünler ve süt ürünlerinin yanı sıra mayonez, et, sos, salam, meyve suları ve yulafli ürünler gibi bir çok gıda maddesi probiyotik taşıyıcısı olarak test edilmiştir (Ong 2007). Probiyotik içeren fonksiyonel süt ürünlerinin tüketimi batı Avrupa, Amerika ve Japonya'da 2005 yılından itibaren %12 değerinde artış göstermiştir. Japonya'daki probiyotik ürünlerin popülerliğinden dolayı marketlerde 53 farklı çeşitte probiyotik içeren ürün bulunmaktadır (Zenith 2007).

Probiyotikler esas olarak laktik asit bakterileridir. Yoğurt yapımında kullanılan mikroorganizmalar (*Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*) dışında tüm laktik asit bakterileri bağırsak florası elemanlarıdır. Probiyotik olarak en sıklıkla kullanılan mikroorganizmalar laktik asit bakterileri (*Lactobacillus* spp, *Streptococcus* spp, *Enterococcus* spp, *Leuconostoc* spp, *Pediococcus* spp, *Bifidobacterium* spp.) ve *Saccharomyces boulardii*'dir. *S.boulardii*, ilk kez Dr. Boulard tarafından uzakdoğuda yetişen tropikal bir meyvenin kabuğundan izole edilen bir maya mantarıdır (Reid vd. 2003).

2.1.1 Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar

Farklı cinslere ait bir çok mikroorganizma probiyotik olarak kullanılmakla beraber özellikle *Laktobasiller* ve *Bifidobakteriler* probiyotik olarak kullanılan bakterilerin başında gelmektedir (Fontana vd. 2013). Patojen ve toksik olmayan bu mikroorganizmalar depolama sırasında üründe canlılığını koruduğu ve tüketim sonrası insanların metabolizmasında yer aldığı ölçüde yararı artmaktadır. Bir probiyotik ürün bu mikroorganizmalardan birini ya da birkaçını içerebilir. İçerdiği mikroorganizma sayısı arttıkça probiyotiğin kullanım alanı genişlemektedir (Akalin vd. 2000).

Çizelge 2.1 Probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar (Prabhu vd. 2012)

<i>Lactobacillus</i> Türleri	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus cellebiosus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus johsonli</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i>
<i>Bifidobacterium</i> Türleri	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium thermophilum</i>
<i>Enterococcus</i> Türleri	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Bacillus</i> Türleri	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus lentus</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus coagulans</i>
<i>Streptococcus</i> Türleri	<i>Streptococcus cremoris</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Streptococcus intermedius</i> , <i>Streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus diacetilactis</i>
<i>Pediococcus</i> Türleri	<i>Pediococcus cerevisiae</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Bacteriodes</i> Türleri	<i>Bacteriodes capillus</i> , <i>Bacteriodes suis</i> , <i>Bacteriodes ruminicola</i> , <i>Bacteriodes amylophilus</i>
<i>Propionibacterium</i> Türleri	<i>Propionibacterium shermanii</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>Leuconostoc</i> Türleri	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Küfler	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>
Mayalar	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida torulopsis</i> , <i>Candida pintolopesii</i>

2.1.2 Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalarda aranan özellikler

Probiyotik mikroorganizmaların bazı teknolojik ve fizyolojik özelliklerinin önemi uzun zaman önce araştırılıp, belirlenmiştir. Probiyotik kullanımında başarılı sonuçlar elde edebilmek için, mikroorganizma kültürleri normal bağırsak florasından seçilip, patojen olmayan, bağırsaklarda hızlı ve verimli bir şekilde kolonize olabilmeli ve yüksek konsantrasyonlarda (10^7 - 10^9 kob/ml ürün) bulunmalıdır. Probiyotik seçiminin ilk aşamasında taksonomik tanımlama metotları ile suşların orijini, habitatı ve fizyolojisi belirlenmesidir. Bu özelliklerin yeni probiyotik suşların seçiminde önemli oldukları bildirilmiştir (Morelli 2007). Probiyotik mikroorganizma seçiminde bir çok kriter tanımlanıp ve önerilmiştir, bunlardan en önemli olanları çizelge 2.2de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2 Probiyotik seçiminde araştırılması gereken önemli kriterler (Yılsay vd. 2000)

Güvenilir ve stabil olmalıdır.
Kullanım sonucu insan veya hayvanlarda yan etkisi olmamalıdır.
Düşük pH ve safra tuzlarına karşı dayanıklı olmalıdır. Mide ve bağırsak kanalıdan geçişleri sırasında canlı kalabilmelidirler.
Epitel yüzeylere tutunmayı sağlayan maddeler (Ekzopolisakkarit, lektin vb.) bulundurmamalıdır.
Bakteri yüzeyi hidrofobik yapıda olmalıdır.
Agregasyon ve koagregasyon yeteneğine sahip olmalıdır.
Bağırsak hücrelerine tutunabilme, kolonize ve metabolize olabilmelidir.
Patojen bakterilere karşı antagonistik etkileri olmalıdır. Bakteriyosin, hidrojen peroksit, laktik asit ve propiyonik asit gibi organik asitler sentezleyebilmelidir.
Gıdanın sindirimi için bazı enzimler salgılamalıdır.
Kısa yağ asitlerin sentezlemesi ve bağırsak hastalıklarını engelleyebilmelidir.
<i>Helicobacter pylori</i> 'nin gelişiminin engelleyebilmelidir.
Antikarsinojenik aktivite gösterebilmelidir.
Kan basıncı ve serumda kolesterol konsantrasyonunu düşürebilmelidir.
İnsan ve hayvan sağlığında çeşitli nedenlerden dolayı kullanılan antibiyotiklere karşı dirençli olmalı.
Konakçı hücrelerde fazla sayıda bulunabilmeli.
Bakterilerin üretim ve depolama aşamalarında canlılığını ve aktivitelerinin koruyabilmeli.
Patojenik olmamalı ve toksik madde üretmemeli.
Karşık probiyotik bakterilerin hazırlamasına uygun olmalı.

Probiyotik mikroorganizmalar fonksiyonel özelliklerini gösterebilmek için, arzu edilen bölgeye aktif ve canlı olarak varmaları gerekmektedir. Probiyotiklerin ürünlerdeki canlılığı ve aktivitesi, onların yararlı etkilerini elde edebilmenin ön şartı olarak belirlenmiştir. Buna rağmen, bazen bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde olduğu gibi, canlı olmayan probiyotik kültürlerin de belirli işlevsel özellikler gösterebildikleri bildirilmiştir. Probiyotik kültürlerin canlılığı ve aktivitesi üretim ve dağıtım sürecinde farklı stres faktörlerinden etkilenmektedir. Genel olarak, probiyotikler su aktivitesi, redoks potansiyeli (oksijen varlığında), sıcaklık derecesi ve asitlikten aşırı derecede etkilenmektedirler. (Endüstriyel çalışmaların ilk fazında, probiyotik kültürlerin seçiminde fonksiyonel kriterleri yerine, daha çok kültür hazırlama sürecinde teknolojik açıdan yüksek verim elde etme ve canlılığı geliştirme teknikleri göz önüne alınmıştır. Bu yüzden probiyotiklerin üretiminde, depolama ve gıda uygulamalarında kültürlerin stabilite ve canlılığını sürdürebilmek için, kültür hazırlama aşamasının çok önemli rolü olduğu belirlenmiştir. Ne yazık ki yüksek asitlik, sübat kısıtlanması, düşük su aktivitesi ve sıcaklık derecesi zararlı değişimlere neden olmakta ve buda kültürün aktivite ve canlılığını tüm süreçlerde etkilemektedir (Vasiljevic 2008).

2.1.3 Probiyotik Mikroorganizmaların Etki Mekanizmaları ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

Son yıllarda probiyotik mikroorganizmaların kullanımının potansiyel sağlık yararlarının doğrulanması ve tanımlanmasına ilişkin bilimsel araştırmalarda önemli derecede bir artış olmuştur. Probiyotik mikroorganizmaların bazı özel suşlarının insanların kullanımı için güvenli ve sağlığa yararlı etkilerinin olduğu bilimsel olarak kanıtlanmıştır (Senok vd. 2005). İnsan sindirim sisteminde 500 çeşitten fazla cinsleri bulunmaktadır. Bunların çoğu, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* veya *Enterococcus* cinsine ait bakterilerdir (David 2003).

Yapılan bir çalışmada laktik asit bakterilerinin bakteriyal ve viral ishalin şiddetini ve süresini azalttığı belirlenmiştir. Bir başka çalışmada *Lactobacillus casei subspecies rhamnosus* ile fermente edilmiş sütün rotavirus kaynaklı ishalin şiddetini ve süresini azalttığı, bağırsakta IgA sekresyonu ve lokal interferon salınımını artırdığı ve bağırsak geçirgenliğini azalttığı saptanmıştır. Gelişmekte olan ülkelerde ölümlerin en önemli nedenlerinden biri olan ishalin tedavisinde probiyotiklerin kullanımının uygun olabileceği vurgulanmıştır (İnanç vd. 2005). Ayrıca günümüzde yapılan son çalışmalar probiyotiklerin insan cilt sağlığı üzerine, soğuk algınlığı ve gribe karşı potansiyel yararları olduğunu ortaya koymuştur (Rouhi vd. 2013).

Çizelge 2.3 Probiyotiklerin sağlık üzerindeki olumlu etkileri aşağıda verilmektedir (Vuyst 2008)

Gıdaların sindirimini kolaylaştırır.
Laktoz sindirim bozukluklarını azaltır.
Fekal enzim aktivitesini azaltır.
Besin ve büyüme faktörlerinin (vitamin, mineral vb.) biyoyararlılığını artırır.
Kolon mikroorganizma varlığını sürdürür ve dengeler.
Bağırsak rahatsızlıkları riskini azaltır ve iyileşme sağlar.
İshali önler. (rotavirüs, akut enfeksiyonlar vb.)
Bozucu ve patojen bakterileri inhibe eder (<i>Streptococcus türleri</i> , <i>Helicobacter pylori</i> , <i>E.coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Clostridium difficile</i> ’ nin neden olduğu sindirim sistemi, solunum ve üriner sistem hastalıkları).
Bağışıklık sistemini geliştirir.
Atopik rahatsızlıklar ve alerji oluşma riskini azaltır (astım, egzema, dermatit, yüksek ateş, gıda alerjisi vb.).
Antikarsinojenik aktivite gösterir.
Kan serumundaki kolesterol seviyesini düşürür.
Kanser oluşumunu engeller.

2.2 Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterisi, terimi çok uzun yıllar boyunca “süt ekşitici organizmalar” terimi ile aynı anlamda kullanılmıştır. Özellikle son yıllarda çok çeşitli fermente ürünlerin üretiminde rol oynayan en önemli endüstriyel mikroorganizmalar olarak bilinmektedir (Batish vd. 1997). Daha sonraları, bu bakterilerin laktik asit üreten diğer bakterilerle olan benzerliği anlaşılmış ve yeni gelişmeler ile yeni tanımlamalar yapılmıştır (Mulholland 1997). LAB içerisinde biyokimyasal ve ekolojik özellikleriyle birlikte filogenetik olarak birbirine yakın olan “*Carnobacterium*, *Alloiococcus*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Aerococcus*, *Lactosphaera*, *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* cinsleri yer almaktadır. *Bifidobacterium* cinsi de filogenetik olarak LAB’ne benzememesine rağmen, biyokimyasal, fizyolojik ve ekolojik özellikleri bakımından benzer olduğundan LAB içerisinde yer almaktadır (Hutkins 2006).

LAB'nin ait olduğu üç familya vardır. *Lactobacillaceae* familyası, (*Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* gibi), *Streptococcaceae* familyası (*Str. thermophilus*, *Str. faecalis* (Yeni adı *Ent. faecalis*), *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lc. lactis ssp. cremoris*, *Leu. mesenteroides*, *Leu. oenos* (Yeni adı *Oenococcus oeni*), *Leu. cremoris*, *Leu. dextranicum*, *Pe. Pentosaceus*, *Pe. acidilactici* gibi) ve *Actinomycetaceae* familyası (*Bi. bifidus* (Eski adı *Lb. bifidus*), *Bi. brevis*, *Bi. adolescens*, *Bi. longum* gibi) (Kılıç 2008). Fermantatif metabolizmaları sonucunda, laktik asit üreten bu bakteriler, Gr (+), bazı durumlarda pseudo-katalaz olmasına karşın genelde katalaz (-), genellikle hareketsiz ve sporsuzdurlar (Axelsson 1998). Tüm laktik asit bakterileri, anaerobik olarak gelişirler, ancak bir çoğu fakültatif anaerob ve mikroaerofiliktirler (Hayaloğlu vd. 2001). Ancak, bazı *laktobasillus* suşlarının hareketli ve endospor oluşturduğu ve bazı *laktobasiller* ve *pediokoklarda* katalaz (+) reaksiyon görüldüğü bilinmektedir (Kılıç 2008). Çoğu laktik asit bakterileri, yalnızca şeker ve fermente edilebilir bileşiklerin metabolizmasından enerji sağladıkları için şekerlerin yüksek bulunduğu ortamlarda çok iyi gelişebilmektedirler. Laktik asit bakterilerinin biyosentetik yetenekleri sınırlı olduğundan, aminoasitler, vitaminler, purinler, pirimidinlerin bulunduğu kompleks besinlere gereksinim duyarlar (Hayaloğlu vd. 2001).

LAB gıda teknolojisinde çok önemli bir role sahiptir. Bunlar özellikle yoğurt, kefir, kımız gibi fermente süt ürünleri, sauerkraut, salatalık turşusu ve salamura yeşil zeytin gibi fermente bitkisel ürünler, ekmek, boza, tarhana ve oğri gibi tahıl ürünleri ve bunun yanında şarap, sucuk, balık sosu gibi pek çok gıdanın olgunlaştırılması, üretimi ve dayanıklılığının sağlanmasında kullanılırlar (Blandio vd. 2003).

LAB laktik asit fermantasyonuyla oluşturdukları ürünlerin cins ve miktarına göre de sınıflandırılır. Zorunlu homofermentatif laktik asit bakterileri glukozu, Fruktöz Di Fosfat (FDP) yolu ile parçalayarak fermantasyon sonucu % 99 oranında laktik asit, %1 oranında diğer bileşikler meydana getirirler. Zorunlu ve fakültatif heterofermentatif laktik asit bakterileri, glukozu Hegzos Mono Fosfat (HMF) yolu ile parçalayarak fermantasyon sonucu % 70 laktik asit ve %30 oranında da diğer bileşikler, özellikle asetik asit, etil alkol ve karbondioksiti oluştururlar (Tekinşen 1994). Homofermantatif

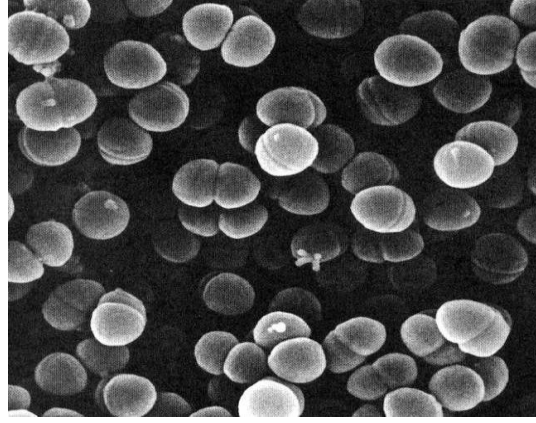
ve heterofermentatif laktik asit bakterilerinin izledikleri metabolik yol birbirinden farklıdır. *L. plantarum* (sinonimleri: *pentosus*, *arabinosus*) glukozu homofermentatif olarak metabolize ederken, pentozları laktat ve asetata Pentoz Fosfat (PP) yolu ile hidroloize etmektedir. *L. casei* de glukozu homofermentatif, ribozu ise heterofermentatif olarak metabolize etmektedir (Salminen vd. 2004).

Fakültatif heterofermantatif laktik asit bakteriler ise heksoz şekerleri laktik aside fermente ederken, pentoz şekerleri laktik asit ve asetik asite fermente ederler. Zorunlu heterofermentatif laktik asit bakterileri, heksoz ve şekerleri laktik asit, asetik asit (veya etanol) ve CO₂'e, pentoz şekerleri ise laktik asit ve asetik aside fermente ederler. Heterofermentatif laktik asit bakterileri FDP yolunun önemli enzimlerinden aldolaz ve trioz-fosfat izomeraz enzimine sahip değildirler. Bu yüzden heterofermentatif türler FDP yolunu kullanamamaktadır. Glukozun yıkımı pentozfosfat (PP) yolu ile olmakta ve sonuçta laktat ile birlikte yaklaşık eşdeğer miktarda etil alkol ve karbondioksit üretilmektedir. Bir kısım heterofermentatif laktik asit bakterileri ise Asetil-P'yi ya kısmen ya da tamamen asetik asite dönüştürebilmektedir (Salminen vd. 2004).

Laktik asit bakterilerine su ve toprakta rastlanılmazken, çeşitli cins ve türlerde olmak üzere, süt ve süt ürünleri üretim yerlerinde, bitki ve bitki atıklarında, insan ve diğer canlıların bağırsak sistemlerinde rastlanır. Ayrıca sağlıklı kadınların vajen florasında dominant olarak bulunmaktadır (Mc groarty 1994).

2.2.1 *Pediococcus* cinsi bakterilerin genel özellikleri

Gr pozitif, katalaz negatif, mikroaerofilik ve fermentatif kok şeklinde bakterilerdir. Koklar tekli ve ikili şekilde bulunabilirler veya kısa zincir veya tetrad oluşturabilirler (Kılıç 2008). Hücreler 0.36-1.43µm çapındadır, hareketsiz olup spor ve kapsül oluşturmazlar (Simpson vd. 1995).



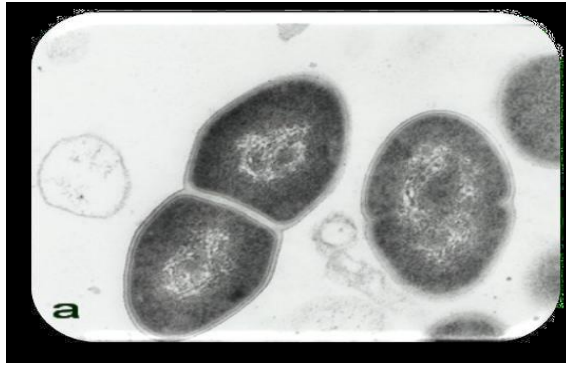
Şekil 2.1 *Pediococcus*

Pediococcus cinsine ait türler tuza dayanıklı homofermantatif türlerdir ve bitkilerde, turşu, bira, şarap gibi fermente ürünlerde bulunurlar (Turantaş 1998). %5.5 tuz konsantrasyonunda rahatlıkla gelişebilmekte olup, %10 tuz konsantrasyonunda zayıf bir gelişme gösterirler. Şekerlerden %0.5-0.9 oranında laktik asit üretirler, gaz oluşturmazlar (Ayhan 2000). 7-45°C'ler arasında gelişme göstermekte olup, optimum gelişme sıcaklıkları ise 25-32°C arasındadır (Ayhan 2000). Bu cinse ait türler tuza toleranslı olmaları, asit üretimlerinin yüksek olması ve oldukça geniş bir sıcaklık aralığında gelişebilmeleri nedeniyle önemlidirler (Turantaş 1998). *Pe. cerevisiae*, *Pe. acidilactici* ve *Pe. pentosaceus* yeni sınıflandırmada verilen *Pediococcus* türleridir. *Pe. cerevisiae* ve *Pe. acidilactici* türleri en önemli starter kültürler arasında yer almaktadır. Bu starterler özellikle turşu ve sucuk fermantasyonunda rol oynarlar. Şarap ve bira gibi alkollü içkilerde ise diasetil üretmeleri nedeniyle kalite kaybına neden olurlar. Yeni sınıflandırmada *Tetragenococcus halophilus* olarak adlandırılan *Pediococcus halophilus* yüksek oranda tuz içeren ürünlerde serbest aminoasitleri dekarboksile edebilme yeteneği nedeniyle problem yaratabilmektedir (Turantaş 1998).

2.2.2 *Enterococcus* cinsi bakterilerin genel özellikleri

Enterococcus'lar küresel, oval ya da kokobasil şeklinde, tek, ikili, veya kısa zincirler halinde olabilirler. Bütün türler gram pozitif ve çoğu hareketsizdirler. Agarlı kültürden alınan örneklerin gram boyamasında bu bakteriler kokobasil şeklinde olabildikleri gibi tiyoglikolat'lı kültürlerden hazırlanan gram boyamalarda yuvarlak ve zincirler halinde

görülürler. *E. gallinarum* ve *E. Casseliflavus*'un dışında kolonilerin çapı, kanlı agarda genellikle 1 veya 2 mm dir. Bazı (yaklaşık 1/3 ünde) *E. faecalis* kültürleri tavşan, at yada insan kanından yapılmış olan kanlı agarlarda β hemoliz yapabilirler, ama koyun kanı kullanılmış olan agarlarda β -hemoliz gözlenmemiştir. Diğer türlerin tümü genellikle α -hemolitikdirler veya hemoliz oluşturmazlar (γ -hemolitik). α -hemoliz yapan suşlar gerçekte peroksit üreten ve non-hemolitik olanlardır. *E. casseliflavus*, *E. mundtii* ve *E. sulfureus* kanlı agar ortamında sarı pigment üretirler (Facklam vd. 1998).



Şekil 2.2 *Enterococcus*

Enterokoklar, glikoz ve laktozu homofermentatif laktik asit fermantasyonu ile pirüvik asite dönüştürürler. Piruvattan da laktat dehidrogenaz enzimi ile L-laktik asit oluştururlar. Sütte Enterokokların asit üretim yetenekleri genellikle düşüktür. Süt kaynaklı enterokokların asit oluşturma kapasitelerinin düşük olması nedeniyle 37°C'de 16-24 saat inkübasyon periyodundan sonra ancak sütün pH'sını 5,0-5,2'ye düşürebildikleri birçok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur (Andrighetto vd. 2001).

Enterococcus'lar endüstriyel potansiyeli açısından önem taşımaktadırlar (Leroy vd. 2004). *Enterococcus* cinsi içinde yer alan *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* gıda endüstrisi açısından özellikle de süt endüstrisinde en önemli türlerdir (Giraffa 2003). probiyotik kültür olarak *Enterococcus* içeren bazı eczacılık ürünleri, insanların klinik tedavisinde kullanılmaktadırlar (Klein 2003). Probiyotik preparatlar gastrointestinal dengeyi geliştirerek gastroenteritisin tedavisinde kullanılmaktadır.

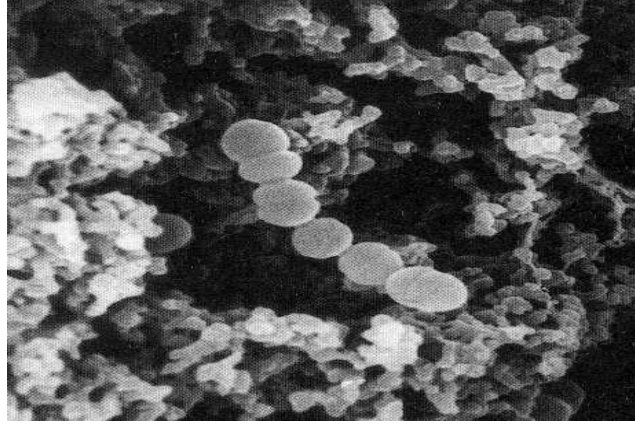
Probiyotik preperatlar hayvanlarda enterik hastalıkları önlemek amacıyla da kullanılmaktadırlar (Hugas vd. 2003).

Enterococcus cinsi içinde probiyotik özellik gösteren iki tür *E. faecium* ve *E. faecalis* olarak bildirilmiştir (Giraffa 2002). *E. faecium*'un insanlarda diyarenin tedavisinde probiyotik olarak kullanımının, antibiyotik uygulamalarına bir alternatif olabileceği düşünülmektedir (Franz vd. 1999). *E. faecium*'un insanlarda probiyotik etkisi ise kolesterolün sindirim sisteminden kana absorpsiyonunun azaltılması şeklindedir (Saavedra vd. 2003).

Enterococcus cinsi bakteri özellikle süt ve et ürünlerinin doğal floralarının bir parçası olmaları nedeniyle, bu ürünlerin fermantasyonunda doğal starter kültürler arasında yer almaktadır (Giraffa 2003). Bu bakteriler çeşitli geleneksel fermente ürünlerin üretiminde faydalı rol oynayabilirler. *Enterococcus*'ların fermente ürünlerin olgunlaştırılması sırasında istenen teknolojik ve metabolik özelliklerine sahip olmaları nedeniyle, *Enterococcus* cinsi bakteriler, özellikle de *Ent. faecium* ve *Ent. faecalis* peynir ve fermente sucukların üretiminde bazı laktik asit bakterileri ile birlikte kullanılan en yaygın starter kültürler arasındadır (Hugas vd. 2003).

2.2.3 *Lactococcus* cinsinin genel özellikleri

Lactococcus cinsi (laktokoklar): Laktik Asit Bakterileri grubunda yer alan, Gram-pozitif, katalaz-negatif, spor oluşturmayan, hareketsiz, fakültatif anaerob ve tek (0,5–1,5 µm), çiftler ya da kısa zincirler halinde bulunabilen kok şekilli bakterilerdir. B hemolitik aktiviteleri yoktur fakat zayıf α hemolitik aktiviteye sahiptirler (Casalta vd. 2008).



Şekil 2.3 *Lactococcus*

Sütün fermentasyonu sonucunda laktozu homofermentatif yolla laktik aside dönüştürmeleri şeklindedir, enerji eldeleri (Furet vd. 2002). Laktokoklar bu metabolik yol ile şeker molekülünden az miktarda enerji elde edebilmektedirler. Enerji kazanımlarını yeterli seviyeye getirebilmek için, bu metabolik yolu çok hızlı bir şekilde kullanırlar. Bu durum sonucunda süt ürünlerinde hızlı asidifikasyon meydana gelmektedir. Laktokoklar, vitaminler ve aminoasitler gibi metabolitler için çok sınırlı bir anabolizmaya sahiptirler. Bu nedenle vitaminler ve aminoasitler gibi gelişme faktörlerinin büyük bir kısmını çevreden sağlamaktadırlar (Furet vd. 2002). Laktokokların optimum gelişme sıcaklıkları 30°C dir. 10°C'nin altında ve 45°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda, %6.5 NaCl varlığında ve ortam pH'sının 9.6 olması durumunda gelişemezler (Stiles vd. 1997). Lancelfield serolojik grup N üyesi olan *Lactococcus* cinsine ait bakterilerde fonksiyonel sitrik asit döngüsü ve solunum enzimleri bulunmamaktadır. Ancak bu bakteriler, düşük oranda oksijeni flavin tip NADH oksidaz, NADH peroksidaz ve süperoksit dismutaz enzimlerine sahip oldukları için kullanabilmektedirler. Katalaz enzim sistemleri olmadığından, aerobik koşullarda hidrojen peroksit ortamda birikebilmekte ve hücresel yapıların bozulmasına yol açarak bakteriyel gelişimi engelleyebilmektedir. Flavon tip NADH oksidazlar ve NADH peroksidazlar, düşük düzeyde hidrojen peroksit redüksiyonunu gerçekleştirdikleri için, laktokoklar mikroaerofilik olarak tanımlanmaktadır. % G+C oranı 34–42 arasında değişim gösteren laktokokların genom büyüklükleri ortalama 2.5 Mega baz (Mb)'dır (Niel vd. 2002).

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

2.3 Laktik Asit Üretimi

Fermente süt ürünlerinde oluşan laktik asit, süt proteinlerini pıhtı şeklinde çöktürerek sindirimini kolaylaştırır. Laktik asit bakterilerinin oluşturduğu laktik asit, sütün pıhtılaşmasının yanı sıra, yoğurda asidik, keskin ve hoş a giden tat kazandırarak, yoğurt aromasının oluşmasında katkıda bulunur (Beyatlı vd. 1997). Fermente süt prosesinde, kültürlerin asit geliştirme oranı sütün bileşiminden, sıcaklık uygulanmasından, türlerin oranından, inkübasyon süresi ve sıcaklığından etkilenmektedir (Beyatlı 1991). Fermantasyon sürecinde oluşan organik asitlerin miktarı ve türü (örneğin: laktik asit, formik asit, vb.) fermantasyon yapan LAB'lerinin tür veya suşlarına, kültür içeriğine ve üreme şartlarına göre farklılık göstermektedir (Hwanhlem vd. 2010). Organik asitlerin antimikrobiyal etkileri pH düşürücü kabiliyetlerinin yanı sıra moleküllerin ayrışmamış formlarından dolayı ortaya çıkmıştır. Organik asitlerin varlığında hücre dışı pH' nın düşük olduğundan ve ayrışmamış asitlerin lipofilik özelliklerinden dolayı kolaylıkla ve pasif transport yoluyla hücrelerin içine girip, sitoplazmanın asidifikasyonuna neden olabildikleri belirlenmiştir. Ayrışmamış asit molekülleri patojen bakterilerin hücre zarındaki elektro-kimyasal proton akışını çöktürerek, ve hücre zarı geçirgenliğini değiştirerek, süstrat transport sisteminin bozulmasına yol açıp ve bu yoldan patojen bakterileri üzerinde bakteriyostatik veya bakteriyosidal etki göstermektedirler (Ammor vd. 2006). *Lactobacillus* türleri kok gruplarına göre daha yavaş asit üreten ama asitli ortamlara daha toleranslıdırlar, bu yüzden fermantasyonun son aşamasında LAB' leri arasında baskın tür olarak bilinmektedirler (Hwanhlem vd. 2010).

LAB'lerinden olan *Enterococcus* lar bilindiği gibi fakültatif anaerob ve fermantatif metabolizmaya sahip kemo-organotrof bakterilerdir. Homofermantatif yoldan glikozu fermente eden bu bakteriler, son ürün olarak L(+)-laktik asit üretmektedirler. Yapılan çalışmalarda, skim milk besiyerinde gelişen *Ent. faecalis* suşlarının laktoz dan laktik asit ve sitrattan asetik asit üretebildikleri belirlenmiştir. Ayrıca, koyun ve keçi sütünde geliştirilen *Ent. faecalis* ve *Ent. faecium* suşlarının, laktoz ve sitratı bir arada kullandıkları takdirde, oldukça yüksek miktarda laktik asit ve daha az miktarda formik ve asetik asit ürettikleri açıklanmıştır. Aynı zamanda, *Enterococcus*'ların özellikle *Ent. durans* suşlarının *Streptococcus* suşlarına göre daha fazla asetik asit ürettikleri bulunmuştur (Moreno vd. 2006).

2.4 Antimikrobiyal Aktiviteleri

Antimikrobiyal maddeler, mikroorganizma gelişimini engelleyen, biyolojik kökenli ikincil metabolitlerdir. Bunlar, mikroorganizmanın çoğalmasını engelleyi "bakteriostatik" veya "fungustatik" olabildikleri gibi; mikroorganizmanın ölümüne sebep olan "bakterisit" ve "fungisit" gibi maddeler de olabilirler. Mikroorganizmalar tarafından üretilen, düşük moleküler ağırlıklı, organik doğal ürünlerdir (El-Adaway 2001).

Glukoz ve laktoz fermentasyonu sırasında oluşan polisakkaritler asetat ve karbondioksit oluşumlarının artmasıyla asit oranını değiştirir. Propiyonik asitin laktik asite kıysala gıdalarda bozulmaya neden olan asit-toleranslı mayalar ile *Salmonella*'yı daha fazla inhibe ettiği bildirilmiştir (Rehberger 1998).

Gıdalarda, sadece gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmaları inhibe etmek veya raf ömrünü uzatmak için kullanılan ve gıdanın duyusal özelliklerinde değişime sebep olmayan antagonistik kültürlerle koruyucu kültürler denilmektedir (Çon vd. 2000).

Laktik asit bakterilerinin diğ er mikroorganizmalara karşı gösterdikleri antagonistik aktivite, ürettikleri laktik asit, asetik asit, hidrojen peroksit, bakteriyosin, diasetil, alkol ve karbondioksit gibi metabolitlerden kaynaklanmaktadır. LAB'ın temel antimikrobiyel etkisi laktik asit üretimi ile pH'daki düşüş olarak belirtilmektedir (Erdoğ rul vd. 2002).

Erdoğ rul vd. (2002) tarafından fermente sucuklardan izole edilen 4 adet *L. pentocaceus* türünün genel inhibisyon etkileri incelenmiş, yalnızca bir türün *Bacillus subtilis*  zerinde etkili olduğu gözlenmiş, dört suşun da *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatus*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*  zerinde herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Yang 2000).

LAB tarafından üretilen antimikrobiyel bileşikler'den organik asitler mikroorganizmalar üzerine inhibitör olarak tesir etmesi, asitin sahip olduğu farklı üç potansiyel etkiye bağlanmaktadır:

1. G   l  asitler, hücre yüzeyinde var olan enzimler üzerinde de düşük PH nedeniyle,enzimleri denatüre ederek inhibitör etkide bulunabilmektedir.
2. Zayıf asitler; sitoplazmik PH'yı d ş r rl r ve doğrudan disosiye olmamış yapılar da metabolizma üzerine özel inhibitör etkiye sahiptir.
3. S fit, nitrat, karbonat gibi asit potansiyelli iyonlar düşük pH'da potansiyel inhibitördür (Erdoğ rul vd. 2002).

Birçok LAB, tarafından sentezlenen protein yapısındaki bileşikler olan bakteriyosinler çeşitli fermente olan ve olmayan gıdalarda bulunmaktadır (Kurt vd. 2005).

Bakteriyosinler, duyarlı mikroorganizmalar üzerinde farklı etkinmekanizmalarına sahiptirler. Hücrenin sitoplazmik zarına bağlanarak, hücre içerisine girip, zarda gözenekler oluşturmaktadır. Böylece düşük molekül ağırlığına sahip hücre bileşenlerinin hücre dışına sızmasına yol açmaktadır. DNA ve RNA gibi hücre için

hayati önemi olan makro moleküllerin degradasyonuna, bu moleküllerle birlikte protein ve peptidoglikan gibi biyolojik yapıların bozulmasına yol açmaktadır (Hampikyan vd. 2007).

Bakteriyosinler bütün duyarlı türler üzerinde aynı etkiye sahip değildir. Ortam pH'sı ve kritik inhibisyon konsantrasyonu gibi faktörlerden etkilenmektedir (Kurt vd. 2005).

Heterofermentatif laktik asit bakterileri tarafından şekerlerin fermantasyonu sonucu üretilen alkol orta etkinlikte bir antimikrobiyel bileşiktir ve patojen bakterilerin büyük çoğunluğuna karşı bakterisit etki göstermektedir. Alkollerin bakteriosidal etkisinin mekanizması proteinleri denatüre etmek özelliklerine dayandırılmaktadır. Ayrıca, sitoplazma zarındaki lipid yapıyı bozup zarın işlevine etki ettiği de belirtilmektedir (Erdoğan vd. 2002).

Bağırsak kökenli laktobasillerin antimikrobiyal özelliğe sahip olduğu rapor edilmektedir (Arıcı vd. 2004). Bağırsak mikroflorasında bulunan probiyotik bakterilerin çeşitli hastalıklara karşı vücudu koruyucu etkisi bulunduğu bilinmektedir. Son yıllarda çocuklarda artan alerjik hastalıklar, ishal, kabızlık vb. rahatsızlıklar nedeniyle çocuk ürünlerinde probiyotik bakteri kullanımı ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. Önceleri probiyotikler sadece gastrointestinal sistemde bulunan bakterileri dengede tutmak amacı ile kullanılırken, yapılan klinik çalışmalarla farklı yararlarının olduğunu ortaya konulmuştur (Goldin vd. 2008). Yine yapılan araştırmalar sonucunda *Lactobacillus rhamnosus* kültürü içeren yoğurt ile standart yoğurt arasında görünüş, tat, aroma, yapı vb. duyuşal özellikler bakımından bir fark bulunamamıştır (Hekmat vd. 2006).

Probiyotik olarak kullanılan LAB'leri, organik asitler (örneğin; laktik asit ve asetik asit), hidrojen peroksit, bakteriyosinler, farklı düşük-moleküler ağırlıklı peptitler, antifungal peptitler veya proteinler ve yağ asitleri gibi çok sayıda antimikrobiyal bileşikler üretmektedirler. LAB'leri tarafından başlıca üretilen organik asitlerden laktik asit ve asetik asit, mide-bağırsak yolunda PH'yı düşürerek patojenler üzerinde bakteriosidal veya bakteriostatik etki göstermektedirler. Laktik asit'in gram negatif patojen bakterilere karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Vasiljevic vd. 2008). Ayrıca,

LAB'lerin ürettiği antimikrobiyal maddelerin intestinal enfeksiyonlarında koruyucu rol aldığı tespit edilmiştir (Bhardwaj vd. 2008).

Enterococcus'lar süt ürünleri gibi belirli gıdaların ve mide-bağırsak sisteminin doğal florası olduklarından, fermantasyon sonucu ürettikleri laktik asit ve hidrojen peroksit gibi antimikrobiyal maddeler eskiden beri gıdaların raf ömrünü uzatmak amacıyla gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadır (Fortina 2008). Fermantasyon var olan karbonhidratların miktarını azaltır ve antimikrobiyal aktiviteye sahip birçok küçük organik moleküller elde edilir ki bunlardan en bilinenleri; laktik ve asetik asittir. Bu inhibitör etkiye sahip primer metabolitlerin yanı sıra *Enterococcus*'larda bakteriyosin gibi başka antimikrobiyal bileşikler de oluşmaktadır (Foulquie vd. 2006). *Enterococcus* bakterileri antimikrobiyal aktivitelerinden dolayı ortamda bulunan *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria* sp., *Clostridium* sp. ve *Vibrio cholera* gibi gıda kaynaklı kontaminant ve patojen mikroorganizmaların gelişimini engellemekte ve ölümlerine neden olmaktadır (Yoon vd. 2008).

2.5 Antibiyotiğe Direnç

Antibiyotikler tıpta kullanılan tüm ilaçlar içinde “mucize ilaç” olarak isimlendirilebilmektedirler. Kullanıma girmelerinden günümüze kadar uzun bir süreç geçmemesine rağmen bu ilaçlar ile ilgili gelişmeler hızla artmış aynı zamanda kullanımları sırasında ve sonrasında ortaya çıkan önemli sorunlar da gündeme gelmiştir. Bu sorunların başında ise antibiyotiklere karşı gelişen bakteriyel direnç yer almaktadır (Akalin 1994).

Beta-laktam grubu antibiyotikler, günümüzde en yaygın kullanılan ve "betalaktam" halkası olarak adlandırılan ortak kimyasal molekülleri ile diğer antibiyotiklerden ayırılan antibiyotik grubudur. İlk olarak 1928 yılında besiyerine tesadüfen düşen *Penicillium notatum* türü mantarın çevresinde stafilokok türü bakterilerin üreyememesi nedeniyle dikkat çekmiştir. Yapılan çalışmalar sonucu 1949 yılında penisilin G geliştirilerek klinik kullanıma sunulmuştur. Sonraki yıllarda geliştirilen yeni beta-laktam grubu antibiyotiklerin tümü, ortak molekül olan beta laktam halkasına bağlı

aminoasitler üzerinde yapılan çeşitli modifikasyonlar sonucunda şekillendirilmiştir (Öncül 2002).

Probiyotik bakteri seçiminde, antibiyotiklere karşı dirençlilikleri önemli bir seçim kriteri olarak görülmektedir (Yuksekdag vd. 2010). Probiyotiklerin özellikle organizmada, gerek sağlıklı bir gelişme gerekse hastalıkların tedavisinde antibiyotiklerin yerine, doğal biyolojik ürünleri destekleyici alternatif ürünler olarak kullanılabileceği önerilmektedir. Bu sayede mikroflorada stabilite sağlandığı gibi dışarıdan alınan diğer maddelerin olumsuz etkilerinin de önüne geçilmiş olacağı ifade edilmektedir. Probiyotiklerin yalnızca tedavi amaçlı olmayıp, tıpta koruyucu amaçlı da kullanılabileceğini, ancak bunun için seçilecek suşların antibiyotiklere ve antifungal ilaçlara dirençli olmasının önemli bir kriter olduğunu rapor edilmektedir (Arroyo vd. 2010).

Hummel ve arkadaşları (2007), laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençliliği üzerine yaptıkları çalışmada, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* ve *Streptococcus* cinslerine ait 45 izolat üzerinde çalışmışlardır. Bu izolatlarının, 40'ının fermente gıdalarda starter kültür olarak kullanılan, 3'ü probiyotik 2'si ise ticari olarak kullanılan türlerden seçilmiştir. Sonuç olarak, suşların eritromisin, kloramfenikol, tetrasiklin ya da β -laktamaz dirençleri %7 gibi çok düşükken buna karşılık, aminoglikosid (gentamisin ve streptomisin) ve siprofloksasine %70 gibi yüksek direnç oluşturduğunu bildirmişlerdir (Hummel vd. 2007).

Enterokokların farklı antibiyotiklere direnç mekanizmaları iki grupta incelenir; interinsik (asıl ve doğal olarak bulunan) direnç ve kazanılan (aktarılabilen) direnç. İnterinsik (asıl) dirençlilik özelliği doğal olarak suşların tümünde yada çoğunda bulunur ve dolayısıyla kromozomal kodlu oldukları düşünülmektedir. Asıl dirençliliğe örnek olarak; *Ent. gallinarum* suşunda bulunan vankomisin dirençliliği (VanC tipi), ve *Ent. faecalis* suşlarında bulunan streptogramin'lere ve aynı şekilde sefalosporin, monobaktam, aminoglikozid (düşük düzeyde), linkozamid (çoğunlukla) ve polimiksin gruplarına olan dirençliliklerdir (López vd. 2009). Kazanılan dirençlilik ise iki yoldan meydana gelir, mevcut DNA mutasyona uğrar veya plazmid ve transpozonlarla

aktarılmış olan yeni DNA parçasıyla ortaya çıkar (Franz vd. 2003). Ampisilin (özellikle *Ent. Faecium*’larda), tetrasiklin, makrolid, aminoglikozid (yüksek düzeyde), kloramfenikol, streptogramin (*Ent. faecium* ve ona bağlı türlerinde) ve quinolon gruplarının yanı sıra glikopeptitlere (vankomisin) olan dirençlilik kazanılan türdendir (Foulquie vd. 2006). Enterokoklar güçlü doğaları ve farklı özelliklerinden dolayı genellikle aminoglikozidler, β -laktamlar (üçüncü kuşak sefalosporinler) gibi bir çok antibiyotik grubunda bulunan antibiyotiklerin düşük konsantrasyonlarına yüksek oranda asıl tolerans göstermektedirler. Özellikle, *Ent. Faecium*’un klinik izolatları penisilinin yüksek konsantrasyonuna asıl (interinsik) olarak dirençlidirler. *Enterococcus*’lar asıl dirençliliklerinin yanı sıra kazanılan genlerden dolayı bazı antibiyotik gruplarına: özelliklede vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptitlere karşı, ve β -laktamlar ve aminoglikosidlerin sinerji etkilerine karşı dirençlilik göstermişlerdir. Dolayısıyla vankomisin-dirençli enterokoklar (VRE) hastane enfeksiyonlarının tedavisinde önemli problemler yaratmaktadırlar (Ogier vd. 2008).

Son yıllarda enterokok suşlarının antimikrobiyal dirençliliklerinin arttığı rapor edilmiştir. Özellikle bazı suşlarda yüksek derecede aminoglikosidlere, β -laktam antibiyotiklere karşı dirençlilik kazanıldığı tespit edilmiştir. *Enterococcus* suşları gıdalarda veya yemlerde starter kültür veya probiyotik olarak uygulamaya alınmadan önce aktarılabilen dirençlilik geni taşımadığı açısından güvenli olduğu tespit edilmelidir (klein 2003).

2.6 Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi ve Probiyotik Önemi

EPS’ler dallanmış tekrarlı şeker birimlerini ve şeker türevlerini içeren uzun zincirli polisakkaritlerdir. Çeşitli mikroorganizmalardan EPS elde edilmektedir ve büyük çoğunluğu laktik asit bakterileri grubundan elde edilir. Farklı LAB’lardan üretilen EPS’lerin kompozisyonları, üç boyutlu yapıları, sertlik, biyokimyasal ve biyofiziksel özellikleri, şeker bağları, polimer uzunluğu, şeker içerikleri, polimer dallanmaları, proteinlerle ilişkileri de birbirinden farklıdır (Badel vd. 2011).

Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen EPS'ler homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadırlar. Homopolisakkaritler bir tip monosakkaritin tekrarlanan birimlerini içermekte olup glukozlar ve fruktanlar olmak üzere 2 büyük gruba ayrılmaktadır. *Leuconostoc mesenteroides* gibi bazı mikroorganizmalar tarafından üretilmektedirler. Heteropolisakkaritler ise oligosakkaritlerin çoklu kopyalarından yapılmış olup her bir tekrarlı birimde iki ya da daha farklı monosakkarit içermekte ve *L. lactis subsp. lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* gibi birçok LAB tarafından üretilmektedirler (Karaca vd. 2010).

LAB heteropolisakkaritleri, mezofilik *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ve *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*; termofilik *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* ve *Streptococcus thermophilus* bakterileri tarafından üretilmektedir (Mıdık 2011).

Ekstraselüler polisakkarit ekonomik olarak çok önemlidir. Çünkü EPS'nin yiyecekler üzerinde fonksiyonel ve sağlığa yararlı etkileri vardır (Welman vd. 2003). Xu ve Arkadaşlarının (2011) yaptıkları bir çalışmada *Bifidobacterium animalis* RH'dan izole edilen EPS'lerin antioksidan özelliğe sahip olduğu rapor edilmiştir. Bakteriyel ekzopolisakkaritler, bakteriyel yüzeyi saklamak diğer bakteriyel yüzeyler veya alt tabaka ile yapışkan bir şekilde ilişkilendirilmek, çevreye karşı koruyucu ajanlar, rizosfer topluluklarda bakteriyel kümeleşme için madde, biyofilmde yapısal stabilizer ve molekülleri uyaran gibi çeşitli görevlerde bulunabilirler. Buna rağmen, fizyolojik özellikleri hala tam olarak bilinmemekle birlikte, sadece birkaçı endüstriyel uygulamalarda kullanılabilmektedir (Badel vd. 2011).

Mikrobiyal ekzopolisakkaritler bakteri ve funguslardan üretilirler. Son yıllarda biyoteknolojistler tarafından dikkat çekmektedir. Çünkü çoğu alanda özellikle tıp alanında uygulamaları mevcuttur. Son yıllarda EPS'lerin beklenmedik etkileri olduğunu bulunmuştur. Örneğin; EPS'lerin in vitro koşullarda insulintrofik aktivitesinin olduğu yani; insulin üretimi ve insulinoma hücrelerinin diabetik ajanlardan koruduğu keşfedilmiştir (Ruiz vd. 2011).

EPS moleküllerinin, antibiyotiklere ve toksik maddelere karşı hücreleri kurumadan, fagositozdan ve faj etkisinden koruduğu, yüksek oksijen gerilimi sağladığı ve yüzey tutunmasında yapıştırıcı işleve sahip olduğu bilinmektedir (Fukuda vd. 2010). EPS'lerin immün sistemi desteklediği, antitümoral ve kolesterol düşürücü aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Welman vd. 2003). EPS, bağırsak epitel dokusu ile bağırsak florasında bulunan bakteriler arasında bir bağ meydana getirir. Dolayısıyla EPS üretebilen suşlar epitele yüksek kapasitede yapışma özelliğine sahiptirler (Böke 2005). Kolesterol düşürücü aktivitesinin yanında immün düzenleyiciliği EPS'nin sağlık için yararlı özelliklerinden birkaçıdır (Makino vd. 2006).

Kitazawa vd. (1998), EPS'nin probiyotik açıdan önemli bir kriter olabileceğini gündeme getirmişlerdir ve EPS'lerin antitümör aktivitesi, antimutagenik aktivitesi, makrofaj aktivitesi gibi bazı immunolojik etkileri olduğu belirtmişlerdir. Ayrıca, laktik asit bakterilerinin hücre duvarında bulunan peptidoglikan ve polisakkaritlerin nitrozamin gibi kansorejen etkili maddelerle kimyasal bağlar oluşturarak onları etkisiz hale getirdiği ileri sürmektedir. EPS'nin bakterinin yüzeye tutunmasında yapıştırıcı özelliğe sahip olması biyofilm oluşturmada etkili olmaktadır. Bu sayede, EPS üreten bakteri baskın olarak kolonize olur ve bulunduğu ortamda stabil olarak kalabilir. Ayrıca: mikroorganizmaların çevrelerine salgıladıkları EPS molekülleri faj ataklarına, organizmadan sitokin salgılanmasına, antibiyotiklere karşı koruyucudur (Aslım vd. 2005a).

LAB'lerin ürettiği eksopolisakkaritler diğer polisakkaritler gibi viskozite arttırıcı, stabilizator, jel oluşturucu ve su toplama özelliklere sahiptir. Bundan dolayı farklı gıdaların üretiminde rol alarak, gıdalara arzu edilen özellikleri kazandırmaktadırlar. Diğer taraftan, eksopolisakkarit üretimi probiyotiklerin bağırsak yüzeyine kolonize olup canlılığını devam ettirebilmesini sağlayan önemli bir özelliktir. *Lactobacillus* bakterileri de diğer birçok bakteri gibi eksopolisakkarit üretme yeteneğine sahiptirler (Ruas vd. 2005).

EPS üretebilen suşlar epitele yüksek kapasitede yapışma özelliğini taşımaktadırlar. EPS'yi enerji kaynağı olarak kullanamazlar. Bakteriler tarafından üretilen EPS'lerin

bazı türlerde kromozomal DNA kaynaklı, bazı türlerde ise plazmid DNA tarafından kodlandığı saptanmıştır (Lim vd. 2004).

Bazı laktik asit bakterileri polisakkarit polimeri salgırlar. Bu ekzopolisakkaritin (EPS) gıdaların üretiminde fonksiyonel işlevleri ve yararlı birçok etkileri olmasından dolayı ekonomik açıdan önemlidir (Welman vd. 2003).

Looijesteijn vd. (2001)'nın bir araştırması: *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* NZ4010 tarafından üretilen EPS'lerin bakteriyi bakteriyofajlar, metal iyonları, nisin ve lizozim gibi çeşitli antimikrobiyal faktörlere karşı koruduğunu göstermiştir. Bu ekolojik fonksiyonlardan farklı olarak, LAB' nin ürettiği EPS' ler çeşitli fermente ürünlerin üretiminde teknolojik öneme sahiptirler. EPS oluşturan *S. thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* içeren “sünme özelliğindeki- ropy” kültürlerin kullanımı, yoğurt üretiminde tekstürü geliştirmek, su salmayı önlemek ve yoğurt viskozitesini arttırmak için alışıldık bir uygulanmaktadır. “Viili” gibi iskandinav süt ürünlerinde, EPS üreten *Lactococcus* suşları kullanılmaktadır. Tekstür oluşumundaki bu role ilave olarak, fermente süt ürünlerinin insan sağlığı üzerine pozitif fizyolojik etkilerinin; LAB'nin çeşitli hücre duvarı bileşenlerine, özellikle hücre dışı (ekstraselüler) polisakkaritlere bağlanabileceği öne sürülmüştür. Günümüzde probiyotik bakteri içeren fonksiyonel gıdaların gelişmesi, hem sağlık ve hem de ekonomik faydaları ile büyüyen bir pazar durumundadır. Probiyotikler sağlığa faydalı olan canlı mikrobiyolojik gıda bileşenleri olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde kullanılmakta olan probiyotik bakteriler; bazıları EPS'leri üreten, ağırlıklı olarak *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium*' lardır. Aslında ileri sürülen, EPS üreten suşların sağlığı destekleyen etkileri bu biyopolimerlerin biyolojik aktiviteleri ile ilişkilidir. Ekzopolisakkaritler; prebiyotik ya da antitümör, antiülser, immünomodüle edici ya da kolesterol düşürücü aktiviteleri sayesinde insan sağlığına katkıda bulunabilirler. Pek çok çalışma, LAB ve fermente süt ürünlerinin antikarsinojenik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Kitazawa ve arkadaşları (1991), liyofilize *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* KVS 20 hücrelerinin intraperitoneal enjeksiyonunun farelerde Sarcoma-180 tümörlerinin gelişiminin durması ile sonuçlandığını, fakat LAB suşunun S-180 tümör hücrelerine karşı yapılan “in vitro” çalışmalarında sitotoksiste göstermediğini bulmuşlardır. Bu

bilgi, bu suşun tümör gelişmesini önlemedeki etkinliğini immün aktivitesi ile ilişkilendirmiştir. Bu araştırmacılar *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* KVS 20 tarafından üretilen salgı maddesinin, antitümör etkisindeki temel bileşen olabileceğini gerçekçi kabul etmektedirler. Daha sonraki bir çalışma, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* KVS 20'nin salgı maddesi ürünleri sayesinde B-hücresi mitojenik aktivitesinin belirgin şekilde arttığını göstermiştir. Nakajima vd. (1995) da *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SBT 0495 EPS'sinin, farelerde intraperitoneal olarak artan özel antikörlerin üretimini yönettiğini tespit etmişlerdir. Bu da EPS' in bağışıklık sistemini destekleyebildiğini göstermektedir. EPS üreten *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL 1073R-1 yoğurt kültürünün antitümör aktivitesi için arabulucu olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Ruas vd. 2002).

LAB'lerin ürettiği eksopolisakkaritler diğer polisakkaritler gibi viskozite arttırıcı, stabilizator, jel oluşturun ve su toplama özelliklerinden dolayı farklı gıdaların üretiminde rol alarak, gıdalara arzu edilen özellikleri kazandırmaktadırlar. Diğer taraftan, eksopolisakkarit üretimi probiyotiklerin bağırsak yüzeyine kolonize olup canlılığını devam ettirebilmesini sağlayan önemli bir özelliktir. *Enterococcus* bakterileri de diğer birçok bakteri gibi eksopolisakkarit üretme yeteneğine sahiptirler. Bu bakterilerin hetropolisakkarit (HePS) üretim yetenekleri de tespit edilmiştir (Mozzi vd. 2006).

2.7 Agregasyon, Otoagregasyon ve Koagregasyon Özellikleri

Agregasyonun kelime anlamı: toplanma, bir araya gelerek kümeleşmedir. Bakterilerin agregasyon özelliğine sahip olması bulunduğu hücrelere tutunma ve dominant olarak kolonize olmasını sağlayacağından özellikle probiyotik açıdan önemli bir kriterdir. Laktik asit bakterilerinin bu özellikleri nedeniyle bulunduğu yüzeye ve birbirlerine yapışarak biyolojik bir bariyer oluşturur bakterilerin agregasyon ve koagregasyon özelliklerine sahip olması, bulunduğu hücrelere tutunma ve dominant olarak kolonize olmasını sağlayacağından özellikle probiyotik açıdan önemli bir kriterdir (Vlkova vd. 2008).

Bakterilerde agregasyonun iki şekilde gerçekleştiği bilinmektedir. Ototregasyon, aynı türe ait mikroorganizmaların birbirlerine tutunarak oluşturdukları hücre kolonileri şeklinde tanımlanmaktadır. Koagregasyon farklı türe ait iki mikroorganizmanın birbirine tutunması şeklinde tanımlanabilir. Probiyotik türler ototregasyon yetenekleri ile bağırsak epitel hücrelerine tutunurken ve koagregasyon yetenekleri ile patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu önleyen bir bariyer görevi gördükleri bilinen özelliklerindendir (Demain 1999).

Bakterilerin agregasyon ve koagregasyon özelliklerine sahip olması, bulunduğu hücrelere tutunma ve dominant olarak kolonize olmasını sağlayacağından özellikle probiyotik açıdan önemli bir kriterdir (Vlkova vd. 2008).

Epitel yzeeye tutunmada agregasyon ile birlikte hidrofobisitenin de gerekli olduğu, ancak agregasyon ile hidrofobisite arasında doğrudan bir ilişki olmadığı belirtilmiştir. Adezyon (tutunma) olayında konak hücre yüzeyinin hidrofob oluşu, yüzey yükleri ile bağlantılıdır. Bakteri ve konak hücre yüzeyleri negatif (-) yüke sahip oldukları için bu itici g özel etkileşimlerle aşılır (Delre 2000).

Laktik asit bakterileri bu özellikleri ile bulundukları epitel üzerinde biyolojik bir bariyer oluştururlar. Böylece patojenlerin epitele yerleşmesi ve burada üremesi engellenmiş olur. Bu yönü ile ototregasyon probiyotik açıdan mikroorganizmalarda aranan bir özelliktir. Reid vd. (1988) *Lactobasillus* türlerinin üropatojenler ile koagregasyonunu göstermiş ve bu fenomenin sağlıklı ürogenital floranın devamlılığı ve tespitinde önemli olduğunu önermişlerdir. Drago vd. (1997) da bağırsaktan izole ettikleri *Lactobasillus* türlerinin ropatojenik *E. coli* ATCC 25922 ve bağırsak patojeni *E. coli* ATCC 35401 türlerinin ikisi ile de farklı derecelerde koagreg olduklarını gözlemişlerdir. alışmalara göre fenomenin açıklanması; laktobasiller ile patojenler geniş bir etkileşim alanı geliştirdikleri ve laktobasiller tarafından üretilen metabolitlerin bu alana dağıldığı (mikroevrelerin inhibe edilmesi) şeklinde açıklanmıştır. Ayrıca, bakterilerin hücre yüzeyleri arasındaki bu etkileşim hücre içi metabolitlerin transfer edilmesini sağlayan iki bakteri sitoplazması arasında sürekli bir bölgeyi oluşturabilmektedir. Aynı zaman da böyle bir mekanizma ile gastrointestinal sisteminde düzenlenebileceği düşünülmüştür.

Probiyotiklerin mukuzoya tutunarak koregasyon yetenekleri ile patojenlere bariyer teşkil ettikleri bildirilmiştir (Fernandez 2003).

Bakterilerin farklı maddelere tutunmasında öncelikle hücre yüzeyinin fizikokimyasal özellikleri, hücre tutunması ile pozitif ilişkisi olan hidrofobisite, otoagregasyon, hemaglutinasyon gibi kesin karakterlerle belirlenmektedir. Streptokoklar, laktobasiller ve bifidobakterilerin hücre tutunması ile hücre yüzey hidrofobisitesi arasında pozitif bir ilişki gözlenmiştir. *Bifidobacterium* türlerinde enterosit benzeri hücrelere tutunmanın en iyi göstergesinin bakteriye ait otoagregasyon ve hemaglutinasyon yeteneklerinin olduğu bildirilmiştir (Zarate 2002a).

2.8 Bakterilerin Farklı PH Değerlerine Toleransının Belirlenmesi

Her mikroorganizmanın gelişebildiği bir optimum, minimum, maksimum pH değeri vardır. Mikroorganizmaların gelişebildiği pH aralığı türlere, ortama, çevre faktörlerine bağılı olarak değişmektedir. LAB türleri gelişme ortamındaki sitrik, hidroklorik, fosforik ve tartarik asitlerin varlığında, asetik asit ve laktik asit varlığına kıyasla daha düşük pH değerlerinde gelişebilmektedir. Uygun olmayan pH değerlerinde mikroorganizmaların hücre geçirgenliğini, Deoksiribonükleik asit (DNA), Ribonükleik asit (RNA) ve bazı enzimlerin fonksiyonlarını olumsuz yönde etkilemektedir (Lu vd. 2003).

Adnan ve Tan (2007), iki geleneksel Malezya ürününden ve kırmızı biber püresinden izole edilen laktik asit bakterileri arasında, pH 4,5, pH 7,0 ve pH 9,0'da *L. brevis* ve *L. plantarum* türlerinin geliştiğini belirtmişlerdir (Adnan 2007).

Kıran (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, hazır gıdalardan izole edilen ve çeşitli kültür koleksiyonlarından temin edilen laktik asit bakterilerinden hiçbirinin pH 2.0 ve pH 3,0'da gelişemediği; pH 4,0, pH 5,0 ve pH 6,0'da hepsinin geliştiği belirtilmiştir. pH 9,6'da *P. pentocaceus* türlerinin bir kısmının geliştiği bazılarının zayıf gelişme gösterdiği, *L. plantarum*, *L. brevis* ve *L. fermentum* türlerinin geliştiği; *Leuconostoc* suşlarının ise zayıf gelişme gösterdiği belirtilmiştir (Kıran 2006).

Tangüler (2010) tarafından şalgam suyundan izole edilen *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* cinslerinin pH 4,0'da gelişme gösterdiği fakat pH 9,6'da hiçbir bakterinin gelişme gösteremediği belirtilmiştir (Tangüler 2010).

2.9 Suşların Farklı Safra Konsantrasyonlarına Toleransının Belirlenmesi

Probiyotik bakterilerin karşısındaki bir diğer engelde safra tuzları ve pankreatin içeren ince bağırsak sisteminde hayatta kalabilmeleridir (Huang vd. 2004).İstenilen, probiyotik organizmaların bağırsakta bulunması ve mide asitliğinde canlı kalabilmesidir (Shah 2001). Safra, bakterilerin büyük oranda lipit ve yağ asidi içeren hücre membranına zarar vererek antimikrobiyal etkiye sahiptir (Darılmaz vd. 2011b).

Bu nedenle, probiyotik olarak kullanılan suşların asit dirençliliklerinin yüksek olması, midenin asidik ortamında canlılıklarını kaybetmeden bağırsak sistemine ulaşp, kolonize olabilmeler için avantaj olabileceği düşünülmektedir. Her gün mideden PH'sı yaklaşık 2,0 civarında olan 3 litre kadar mide suyu salgılanmaktadır. Bu nedenle, probiyotik mikroorganizmaların kolon'a ulaşp, orada kolonize olması için gerekli olan ilk koşul mide asidinden en az oranda zarar görmesidir (Vernazza vd. 2005).

Probiyotik seçiminde kullanılan diğer önemli bir kriter ise suşların safra asitlerine direnç özellikleridir (Vasiljevic vd. 2008). Safra organik (safra tuzları, kolesterol, fosfolipitler, bilirubin) ve inorganik (su ve elektrolitler) bileşiklerin sulu bir karışımından oluşur (Champe vd. 1997). Fosfatidilkolin (lesitin) ve safra tuzları nicelik olarak safranin en önemli bileşenleridir. Safra, gerektiği zaman doğrudan safra kanalı yoluyla karaciğerden onikiparmak bağırsağına geçer veya sindirim için hemen gereksinim yoksa safra kesesinde depolanabilir. En çok bulunan safra asitleri kolik asit ve keno-deoksikolik asittir. Safra asitleri, amfipatiktirler. Bu yüzden, moleküller polar ve hem nonpolar bir yüze sahip olup, bağırsakta yağları çözücü ajanlar olarak işlev görebilirler. Böylece diyetle alınan lipitlerin, pankreasın sindirim enzimleri tarafından yıkılması için yardımcı olurlar (Champe vd. 1997).

Safra asitleri karaciğerde çok basamaklı bir metabolik yol tarafından sentez edilirler. Oluşan bileşikler “primer” safra asitleri olarak adlandırılan kolik asit ve kenodeoksikolik asittir. Safra asitleri karaciğerden ayrılmadan önce bir molekül glisin ya da taurin amino asitleri ile konjuge edilir. Konjugasyon, safra asidinin karboksil grubu ile eklenen bileşiğin amino grubu arasında oluşan amid bağı tarafından sağlanır. Oluşan bu yeni bileşikler safra tuzları olarak adlandırılırlar (Champe vd. 1997).

Günde 500-700 ml miktarında ince bağırsağa salgılanan safra, bakterilerin büyük oranda lipit ve yağ asidi içeren hücre membranına zarar vererek antimikrobiyal etki göstermektedir (Dunne vd. 1999). Safra asitleri kalın bağırsağa varınca mikrobiyal aktivite sonucu tamamen kimyasal değişimlere uğramaktadır (Demain 1999). Bu nedenle probiyotik olarak kullanılacak bakterilerin bağırsaklarda fonksiyon gösterebilmeleri için safraya karşı dirençli olmaları gerekmektedir (Succi vd. 2005).

Genellikle, probiyotiklerin seçimindeki safra toleransı çalışmalarında %0,15 ve %0,30 konsantrasyonlarında safranin kullanılması önerilmektedir (Huang vd. 2004).

Yapılan çalışmalarda, insandaki safra konsantrasyonuna yakın bir değer olmasından dolayı safraya dirençli olan suşları belirlemek için özellikle %0,30'lük safra konsantrasyonunun kritik bir değer olduğu bildirilmiştir (Erkkilä vd. 2000).

Ayrıca safraya toleranslı bakteri türlerinin seçimi laktoz intoleransı olan insanlarda, laktoz sindirimi açısından önemli olduğu bildirilmiştir. Bu nedenlerden dolayı probiyotiklerin asit ve safra toleransı, bu bakterilerin seçiminde temel kriterlerden birini oluşturmaktadır (Zarate vd. 2000).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Araştırma gıda kaynaklı 10 adet LAB bakteri ile yürütülmüştür. Kültürler Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edildi. çalışmada kullanılan bakteriler çizelge 3.1 gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan bakteri tür adları ve kodları

Bakteriler	Bakteri Kodu
<i>Enterococcus durans</i>	51
<i>Enterococcus faecalis</i>	79
<i>Enterococcus faecium</i>	03
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	35
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	99
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	33
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	102
<i>pediococcus acidilactici</i>	DT9
<i>pediococcus pentosaceus</i>	P19
<i>pediococcus pentosaceus</i>	C24

3.1.1 Çalışmada kullanılan besiyerleri ve çözeltiler

Çalışmada bakterilerin antibiyotik duyarlılığı ve antimikrobiyal aktivitelerinde MRS sıvı besiyerlerinden yararlanmıştır. Bakterilerin diğer aktivitelerinde TGE sıvı besiyeri kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan MRS ve TGE Sıvı Besiyerleri çizelge 3.2 - 3.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 MRS (Man Rogosa and Sharpe) Sıvı Besiortamı

BİLEŞEN	Miktar (g/l)
Pepton	10
Beef Eksrakt	10
Yeast Ekstrakt	5
Glikoz	20
K ₂ HPO ₄	2
Sodyum Asetat.3H ₂ O	5
Tri Amoniyum Sitrat	2
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,05
Tween 80	1,08 ml

MRS besiyerleri için maddeler tartılarak distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmış ve 1 M HCl ve 1 M NaOH ile pH 6,2'ye ayarlanarak otoklavda 121°C'de 15 dak. steril edilmiştir (Halkman 2005).

Çizelge 3.3 TGE (Trypton,Glukoz,Maya Ekstrakti) Sıvı Besiortamı

BİLEŞEN	Miktar(g/l)
Trypton	10
Glukoz	10
Yeast Ekstrakt	10
Tween 80	1
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,05
MnSO ₄ .4 H ₂ O	0,05

TGE besiyerleri için maddeler tartılarak distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmış ve 1 M HCl ve 1 M NaOH ile pH 6,8'ye ayarlanarak otoklavda 121°C'de 15 dak. steril edilmiştir.

Araştırmada kullanılan patojan test bakterilerinin geliştirilmesi için Nutrient Broth besiyeri kullanılmıştır. Bu besiyerinin içeriği çizelge 3.4 de verilmiştir.

Çizelge 3.4 Nutrient Broth sıvı besiyeri

BİLEŞEN	Miktar (g/l)
Beef Ekstrakt	1
Yeast Ekstrakt	2
Pepton	5
Sodyum Klorit	5

Nutrient Broth sıvı besiyeri için maddeler tartılarak distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmış ve besi ortamının pH'sı 1 M HCl ve 1 M NaOH'le 6,8'ye ayarlanmıştır. Katı besiyeri hazırlamak için besiyerine %1,5 oranında agar (Merck) eklenmiştir. Otoklavda 121°C'de 15 dak steril edilmiştir (Halkman 2005).

3.1.2 Bakterilerin muhafazası

1,5 ml'lik ağzı kapaklı tüplere yaklaşık 800 µl gliserol aktararak, 121 °C'de 15 dak. sterilize edilmiştir. Bakteriler uygun sıvı besiortamında iki kez ard arda aktifleştirilip, aktif kültürlerden 200 µl gliserol içeren steril tüplere paralelli olarak aktarılmıştır. Suşlar derin dondurucuda -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Muhafazaya alınan stoklar iki ayda bir aktifleştirilerek yenilenmiştir (Sağlam 2000).

3.1.3 Araştırmada kullanılan test bakterileri

Araştırmada kontaminant ve patojen test bakterileri olarak *Escherichia coli* ATCC11229, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus* RSKK 863, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Listeria monocytogenesis* ATCC 7644 kullanılmıştır. Test bakterileri Nutrient Broth sıvı besiortamında 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir.

3.2 Metotlar

3.2.1 LAB bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları

LAB geliştirilmesi ve aktifleştirmesinde TGE sıvı besiyeri kullanılmıştır. Tüm eneyssel çalışmalar bakterilerin 35°C’de 18-24 saat inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir.

Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kullanılan patojen mikroorganizmalar Nutrient Broth sıvı besiyerinde 37°C’de 24 saat geliştirilmiştir. Yapılan tüm çalışmalarda arda arda iki kez aktifleştirilen kültürler kullanılmıştır.

3.2.2 Ekzopolisakkarit (EPS) üretimi

LAB suşlar TGE sıvı besi ortamında 35°C’de 24 saat iki kez aktifleştirilmiştir. Aktif kültürlerin optikal yoğunlukları spektrofotometrede (Digilab Hitachi U-1800) 600nm dalga boyunda 0,600’e ayarlanmıştır. OD değerleri ayarlanan bakterilerden 5 ml’lik TGE sıvı besi ortamlarına ikişer paralelli olarak inoküle edilerek, 35°C’de 18-24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürlerden 1ml ependorf tüplerine alınarak, 100°C’de 15 dak. kaynatılmıştır. Örnekler oda sıcaklığına geldikten sonra üzerine %0,17 oranında %85’lik Trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi eklenmiş ve 15,000 rpm’de 25 dak. santrifüj edilmiştir. Süpernatant temiz bir ependorf tüpüne alınarak üzerine eşit hacimde etanol eklenerek 15 dak 15,000 rpm’de santrifüj edilmiş ve EPS’nin presipite olması sağlanmıştır. Pelletler 1 ml steril distile suda çözüldükten sonra, üretilen EPS miktarının tayini için fenol sülfirik asit metodu uygulanmıştır (Torino vd. 2001).

Fenol Sülfirik Asit metodu:

Örneklerin üzerine 0,5 ml fenol (Sigma) ve 5 ml sülfirik asit (Merck) hızlı bir şekilde eklenerek oda sıcaklığında 10 dak. bekletildikten sonra iyice karıştırılarak 30°C’de 20 dak. bekletilmiştir. Örneklerin optik yoğunlukları 490 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Kültürlerin ürettiği EPS miktarlarını hesaplamak

için 5-100 mg/l arasında değişen oranlarda glikoz (Merck) çözeltisi kullanılarak standart çıkarılmış ve bu standarda göre üretilen EPS miktarı mg/l olarak belirlenmiştir.

3.2.3 Kültürlerin farklı besiyerlerindeki pH ve yüzde asit üretimlerinin belirlenmesi

Aktif kültürleri Skim Milk (SM) ve (TGE) sıvı besi yerlerine %2 oranında aşılınmış ortamında 35°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kültür besiyerinin pH değerleri Metler Toledo marka pH metre ile ölçülmüştür. Kültürlerin % asitlik üreti pH değerleri ölçülen 10 ml'lik kültür, distile suyla 100 ml'ye tamamlanmıştır. 250 ml cam erlene aktarılan karışım üzerine 2-3 damla fenol fitaleyn renk indikatörü damlatılarak, 0,1 M NaOH (Merck) çözeltisi ile titre edilmiştir. Harcanan NaOH miktarına bakterilerin ürettiği asit titre edilebilir yüzde asitlik olarak hesaplanmıştır (Demirci vd. 1994).

$$\% \text{ Asitlik} = \text{Harcanan } 0,1 \text{ N NaOH (ml)} \times 0,9 / \text{örnek (ml)}$$

3.2.4 Antibiyotik duyarlılık

Çalışmada, LAB bakterileri üzerinde protein sentezi inhibitörü Gentamisin (CN) 10 µg ,antimikrobiyal etkiye sahip Nitrofurantoin (F) 300 µg , hücre duvar sentezini inhibe eden Penisilin (P) 10 U, Sitoplazmik zar sentezi inhibitörü Polimiksin (PB) 300 U , Nükleik asit sentezi inhibitörü Ofloksasin (OFX) 5 µg antibiyotiklerinin inhibisyon etkileri disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir (Sanchez vd. 2007).

Yöntem şu şekilde uygulanmıştır:

LAB bakterileri MRS sıvı besi ortamında 37±1°C'de 18-20 saat arda arda ikişer paralelli olarak aktifleştirilmiştir. Hazırlanan MRS agar petrilere 25 ml aktarılıp, oda sıcaklığında donmaya bırakılmıştır. Aktif kültürlerin yoğunlukları 0,5 McFarland bulanıklığına eşdeğer olarak ayarlandıktan sonra 100 µl alınıp, MRS plaklarına aktarılmış ve homojen bir şekilde yayılması sağlanmıştır. Antibiyotik diskleri petri

kutusunun kenarından besiortamının üzerine yerleştirilmiştir. Petriler 37°C’de 18-20 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde antibiyotik disk çevresinde oluşan zonların çapı kumpas ile milimetrik olarak ölçülmüştür (Bilge vd. 2005).

3.2.5 Antimikrobiyal Aktivite

LAB bakterilerin aktif kültürlerinden MRS broth besiyerine ekim yapıp, 37±1°C’de 18-20 saat inkübe edilmiştir. Aktif kültürler 12000 dev/dak’da 10 dak. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant adı verilen berrak kısım steril şartlar altında 0,45 µm’lik steril filtre kullanılarak mikrofiltrasyon yolu ile sterilize edilmiştir.

Araştırmada test bakterileri olarak *E. coli* ATCC 11229, *E. coli* O157:H7, *B. Cereus* RSKK 863, *S. enteritidis* ATCC 13076, *S. aureus* ATCC 25923 ve *L. Monocytogenes* ATCC 7644 suşları kullanılmıştır.

Test bakterilerinin aktifleştirilmesi Nutrient Borth sıvı besiyerinde 24 saat 37±1 °C sıcaklıkta yapılmıştır. Bu kültürlerden steril plaklara 100 µl aktarılmıştır. Plaklar üzerine sterilize edilmiş ve 50 °C’ye kadar soğutulmuş Nutrient Agar besiyerinden 25 ml ilave edilip, homojen bir şekilde kültür ve besiortamının karışımı sağlanmıştır. Homojenlik sağlandıktan sonra petri kabı içerisindeki besiyerinin donması için beklenilmiştir. Donan besiyeri üzerinde 6 mm çapında steril ortamda kuyucuklar açılmıştır. Daha önceden mikrofiltrasyonla steril edilmiş LAB bakteri filtratlarından 100 µl kuyucuklara konulup, 37±1 °C inkübasyon sıcaklığında, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyucukların çevresinde oluşan inhibisyon zonların çapı kumpas yardımı ile ölçülmüştür (Liasi vd. 2009).

3.2.6 Otoagregasyon

Otoagregasyon yeteneklerinin belirlenmesinde Bakteriler TGE sıvı besiyerinde 35°C’de 18-24 saat aktifleştirilmiştir. Aktif kültürler 10000rpm’de 15dak santrifüj edilmiştir. Elde edilen pellet, iki defa fosfat tamponu (PBS) ile yıkanmış ve pellet yine PBS

içerisinde süspanse edilmiştir. Yıkanan kültürlerin optik yoğunlukları 600 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Digilab Hitachi U-1800) 0,600'e ayarlanmıştır. 4 saat oda sıcaklığında hareket ettirilmeden bekletilen süspansiyonun üst fazından alınan örneğin optik yoğunluğu 600 nm'de ölçülmüştür. Kültürlerin yüzde Otoagregasyon yetenekleri, aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Collado vd. 2008).

$$\% \text{ Otoagregasyon} = [(OD_1 - OD_2 / OD_1) \times 100]$$

OD₁: İlk optikal dansite

OD₂: 4 saat sonraki optikal dansite

3.2.7 Koagregasyon

Suşların koagregasyon yeteneklerinin belirlenmesinde TGE sıvı besiyerinden yararlanmıştır. LAB ve test bakterilerinin (*E. coli* ATCC 11229) optik yoğunlukları 600 nm'de 0,600'e ayarlanmıştır. LAB ve test bakteri eşit hacimlerde cam deney tüplerine alınmış ve homojen bir karışım elde edilmiştir. Karışık süspansiyonları oda sıcaklığında 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda karışımın optik yoğunluğu yine 600 nm'de ölçülmüştür. Kültürlerin %koagregasyon yetenekleri, aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Collado vd. 2008).

$$\% \text{ Koagregasyon} = [(OD_1 + OD_2) - 2(OD_3) / (OD_1 + OD_2) \times 100]$$

OD₁: *Propionibacterium* spp. suşlarının optikal dansitesi

OD₂: *E. coli* ATCC 11229'un optikal dansitesi

OD₃: Karışımın 4 saat sonundaki optikal dansitesi

3.2.8 Farklı pH değerlerine toleransı

Suşlar 35°C'de 24saat iki kez TGE sıvı besi ortamında aktifleştirilen kültürlerin optikal yoğunlukları spektrofotometrede (Digilab Hitachi U-1800) (600 nm) 0,600'e ayarlanmıştır. OD değerleri ayarlanan bakterilerden %2 oranında, pH'sı 4 M HCl (Merck) ile 2, 3, 4, ve 5'e ayarlanan TGE sıvı besiyerlerine inoküle edilerek, 35°C'de

24 saat inkübe edilmiştir.İnkübasyon bitiminde kültürlerin OD değeri 600 nm de ölçülmüştür. Elde edilen OD değerleri kontrol grubu (pH'sı 6,8 olan TGE sıvı besiyerinde gelişen kültürün yoğunluğu) ile karşılaştırılarak farklı pH değerlerinin suşlar üzerindeki yüzde canlılık değeri hesaplanmıştır (Chung vd. 1999).

% Canlılık: $OD_1/OD_2 \times 100$

OD1: Bakterilerin farklı pH ortamlarındaki yoğunlukları

OD2: Kontrol

3.2.9 Farklı safra konsantrasyonlarına toleransı

Suşlar 35°C'de 24 saat iki kez ard arda TGE sıvı besi ortamında aktifleştirilmiştir. LAB kültürlerinin optikal yoğunlukları 600 nm'de 0,600'e ayarlanmıştır. OD değerleri ayarlanan bakterilerden %2 oranında, %0 (kontrol), %0,06, 0,15 ve 0,30 oranlarında safra (Sigma) içeren TGE sıvı besiyerlerine inoküle edilerek 35°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde kültürlerin OD değerleri kontrol grubu (safra içermeyen TGE sıvı besiyerinde gelişen kültürün yoğunluğu) ile karşılaştırılarak farklı safra konsantrasyonlarının suşlar üzerindeki yüzde canlılık değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Chung vd. 1999).

% Canlılık: $OD_1/OD_2 \times 100$

OD1: Bakterilerin farklı safra ortamlarındaki yoğunlukları

OD2: Kontrol

3.2.10 İstatistiksel analizler

Tüm çalışmalarda iki farklı paralelin ortalama sonuçları verilmiştir. İstatistiksel analizlerde SPSS Inc. Software (16.0 Versiyonu; SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılmıştır. Pearson korelasyonuna göre, suşların (yüzde asit –EPS), (EPS-otoagregasyon), (EPS-koagregasyon) arasında korelasyon olup olmadığı incelenmiştir. Ayrıca, farklı pH ve safra konsantrasyonunun canlılık üzerindeki ilişkisini ortaya koymak amacıyla SPSS 16.0 bilgisayar programı ile regresyon analizi uygulanmıştır.

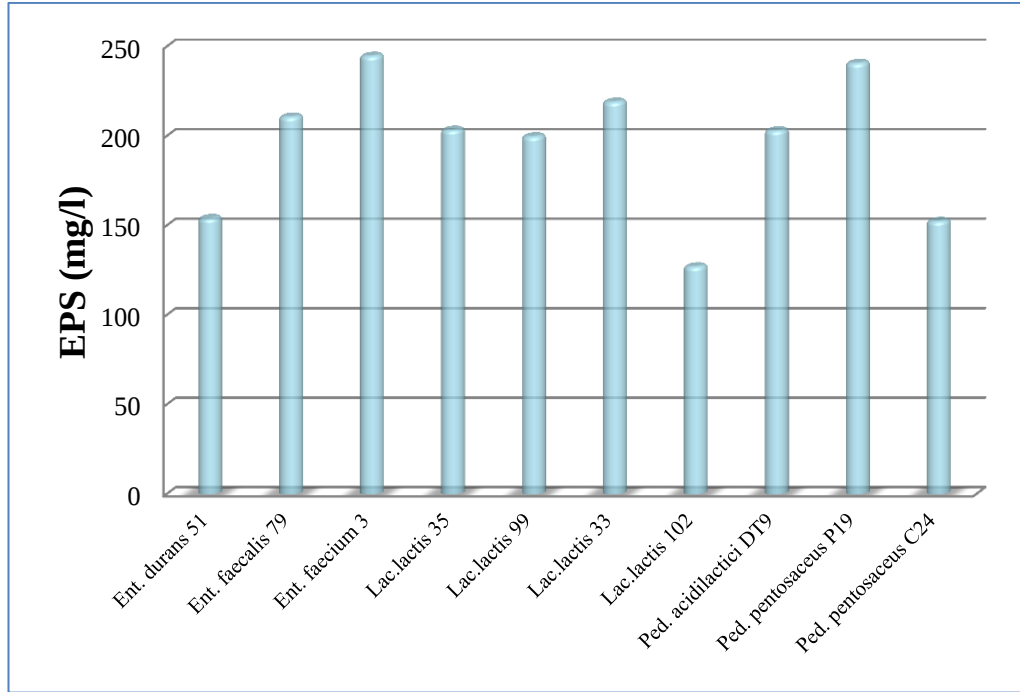
4. DENEYSEL BULGULARI

4.1 Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi

Bakterilerin EPS üretim miktarları, fenol sülfürik asit metodu ile spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1 Şekil 4.1). Suşların EPS üretim miktarları 127,30–245,00 mg/l arasında değiştiği gözlenmiştir. EPS üretimi en yüksek olan suş *Ent. faecium* 3 (245,00 mg/l)'dır. EPS üretimi en düşük suş ise *Lac.lactis* 102 (127,30 mg/l) olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.1 LAB bakterilerin ekzopolisakkarit üretimleri (mg/l)

Bakteriler	EPS mg/l
<i>Ent. durans</i> 51	154,33±2,25
<i>Ent. faecalis</i> 79	211,00±0,24
<i>Ent. faecium</i> 3	245,00±0,12
<i>Lac. lactis</i> 35	203,67±2,95
<i>Lac. lactis</i> 99	200,00±5,18
<i>Lac. lactis</i> 33	219,33±7,19
<i>Lac. lactis</i> 102	127,30±1,32
<i>Ped. acidilactici</i> DT9	203,29±1,65
<i>Ped. pentosaceus</i> P19	241,00±0,47
<i>Ped. pentosaceus</i> C24	152,67±2,13



Şekil 4.1 LAB bakterikerin EPS üretim miktarlarının karşılaştırılması

4.2 Kültürlerin Farklı Besiyerlerindeki Yüzde Asit Üretimleri

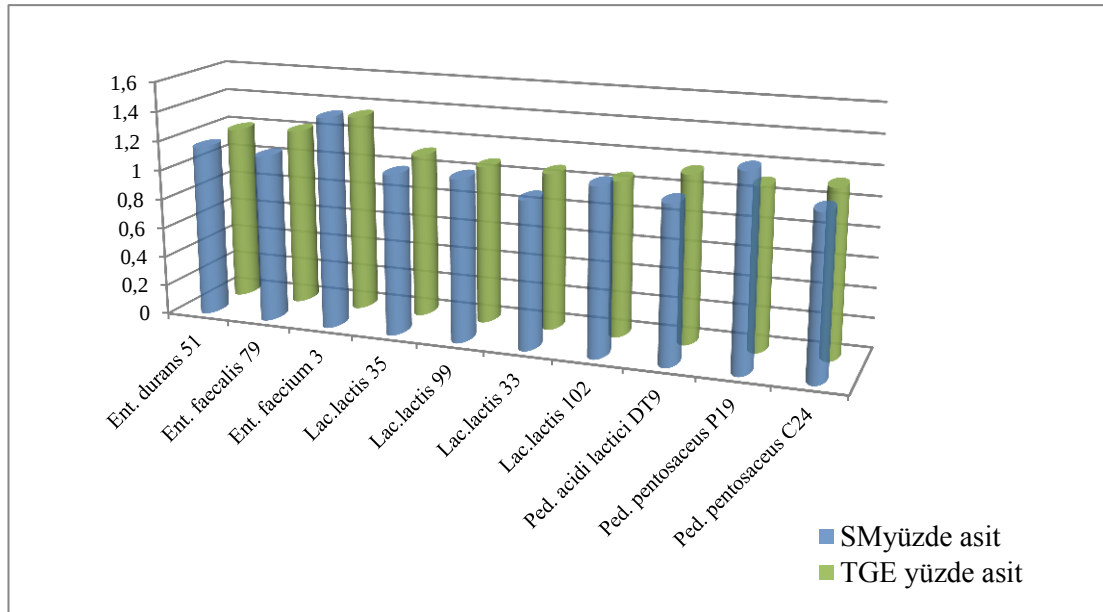
Bakterileri kültürlerinin Skim Milk (SM) ve TGE besiyerlerinde ürettiği yüzde asitlik miktarları Çizelge 4.2’de verilmiştir. LAB’ların TGE sıvı besiortamındaki 24 saatlik kültürlerinin titre edilebilir yüzde asitlik miktarları en düşük %1,05 (*Lac.lactis* 102) ve en yüksek %1,34 (*Ent. faecium* 3) suşlarında belirlenmiştir. TGE sıvı besiortamında, *Ent. durans* 51 (%1,19), *Ent faecalis* 79 (%1,21) ve *Ent. faecium* 3 (%1,34) oranında yüksek asit ürettikleri gözlenmiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.2).

Suşların, Skim Milk besiortamında 24 saat inkübasyon sonunda en düşük %0,99 titre edilebilir yüzde asit miktarı *Lac.lactis* 33 kültüründe ve en yüksek %1,42 asit üretimi ise *Ent. faecium* 3 suşda belirlenmiştir. Skim Milk besiortamında *Ent. durans* 51 (%1,16), *Ent. faecalis* 79 (%1,13), *Ent faecium* 3 (%1,42), *Lac. lactis* 102 (%1,12) ve *Ped. pentosaceus* P19 (%1,29) oranlarında asit üretikleri belirlenirken, bu suşların asit üretimleri diğer suşlara kıyasla yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.2, Şekil 4.2).

Suşların bu iki besiyerindeki yüzde asit üretimleri arasında doğrusal bir korelasyon olduğu görölmüş ve $r=0,6991$ olduğundan bu ilişki orta düzeyde anlamlıdır ($p<0,05$).

Çizelge 4.2 Bakterilerin TGE ve SM besiyerlerinde ürettikleri yüzde asitlik miktarları

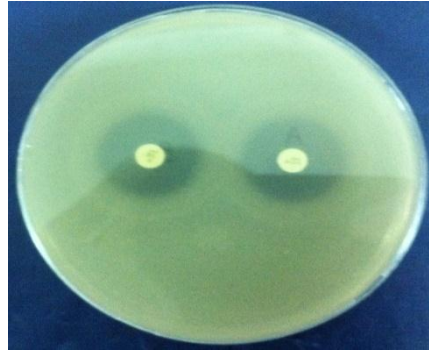
Bakteriler	Skim Milk(%)	TGE(%)
<i>Ent. durans</i> 51	1,16 ±0,01	1,19±0,03
<i>Ent. faecalis</i> 79	1,13±0,03	1,21±0,02
<i>Ent. faecium</i> 3	1,42±0,02	1,34±0,03
<i>Lac. lactis</i> 35	1,08±0,02	1,11±0,03
<i>Lac. lactis</i> 99	1,09±0,01	1,07±0,02
<i>Lac. lactis</i> 33	0,99±0,02	1,06±0,01
<i>Lac. lactis</i> 102	1,12±0,03	1,05±0,01
<i>Ped. acidilactici</i> DT9	1,05±0,01	1,13±0,02
<i>Ped. pentosaceus</i> P19	1,29±0,01	1,09±0,02
<i>Ped. pentosaceus</i> C24	1,08±0,02	1,12±0,02



Şekil 4.2 LAB bakterilerin TGE ve SM besiyerlerinde ürettikleri yüzde asitliklerinin karşılaştırılması

4.3 LAB'ların Antibiyotik Duyarlılık

Farklı antibiyotiklerin (Gentamisin (CN) 10 µg , Nitrofurantoin (F) 300 µg ,Penisilin (P) 10 U ,Polimiksin (PB) 300 U ,Ofloksasin (OFX) 5) LAB'lar üzerine inhibisyon etkisi Bölüm 3.2.8'da anlatıldığı gibi disk difüzyon yöntemi ile tespit edilmiştir. *Ent. durans* 51 antibiyotik Penisilin (P) 10 U karşı duyarlılığı (Resim 4.1) gösterilmiştir. Antibiyotiklerin LAB suşları üzerindeki etkileri CLSI standardına göre değerlendirilip, çizelge 4.4'te gösterilmiştir.



Resim 4.1 *Ent. durans* 51 suşun Penisilin (P) 10 U karşı duyarlılığı

Çizelge 4.3 CLSI kriterlerine göre antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi

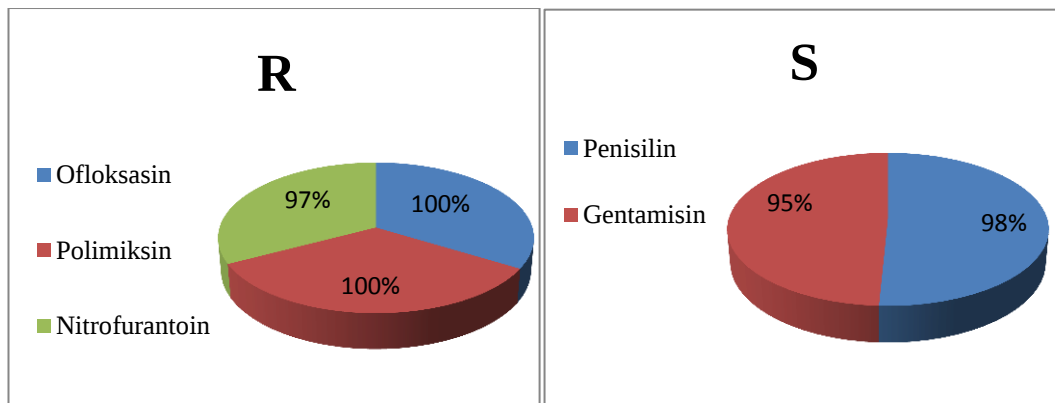
Etki Mekanizması	Antibiyotik	Dirençli	Orta duyarlı	Duyarlı
Hücre duvarı sentezi inhibitörü	Penisilin (P) 10U	≤11	12-21	≥22
Hücre duvarı sentezi inhibitörü	Ampisilin (AMP) 10µg	≤11	12-13	≥14
Protein sentezi inhibitörü	Streptomisin (S) 10µg	≤11	12-14	≥15
Protein sentezi inhibitörü	Gentamisin (CN) 10µg	≤12	13-14	≥15
Nükleik asit sentezi inhibitörü	Nalidiksik asit (NA) 30µg	≤13	14-18	≥19
Nükleik asit sentezi inhibitörü	Rifampisin (RD) 5µg	≤15	-	≥16
Antimikrobiyal	Nitrofurantoin (F) 300 µg	≤14	15-16	≥17
Nükleik asit sentezi inhibitörü	Ofloksasin (OFX) 5 µg	≤14	15-21	≥22
Protein sentezi inhibitörü	Kloramfenikol (C) 30µg	≤12	13-17	≥18
Sitoplazmik zar sentezi inhibitörü	Polimiksin (PB) 300 U	≤8	9-11	≥12
Protein sentezi inhibitörü	Kanamisin (K) 30 µg	≤13	14-17	≥18

Çizelge 4.4 LAB suşların antibiyotik duyarlılıkları

SUŞLAR	OFX 5µg	PB 300U	p 10U	F 300g	CN10µg
<i>Ent. durans</i> 51	R	R	S	R	R
<i>Ent. faecalis</i> 79	R	R	S	S	I
<i>Ent. faecium</i> 3	R	R	I	R	S
<i>Lac.lactis</i> 35	R	R	S	R	R
<i>Lac. lactis</i> 99	R	R	S	R	R
<i>Lac. lactis</i> 33	R	R	I	R	R
<i>Lact. lactis</i> 102	R	R	S	S	S
<i>Ped. acidilactici</i> DT9	R	R	S	R	S
<i>Ped. pentosaceus</i> P19	R	R	S	R	S
<i>Ped. pentosaceus</i> C24	R	R	S	S	S

R: Dirençli, S: Duyarlı, I: Orta Derece Duyarlı.

Tüm suşların Ofloksasin ve Polimiksin antibiyotiklerine karşı dirençli oldukları belirlenmiştir .Nükleik asit sentezi inhibitörü Ofloksasin (%100), Sitoplazmik zar sentezi inhibitörü Polimiksin (%100), Antimikrobiyal Nitrofurantoin (%97) oranlarında yüksek dirençlilik gösterdikleri tespit edilmiştir. Ayrıca, suşlarının hücre duvar sentezini inhibe eden penisilin (%98), Protein sentezi inhibitörü Gentamisin (%95) oranlarında duyarlı oldukları bulunmuştur (Çizelge 4.4, Şekil 4.3). Ancak, istatistiksel analizler sonucunda suşların antibiyotik duyarlılık ve EPS üretimleri arasındaki korelasyon anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

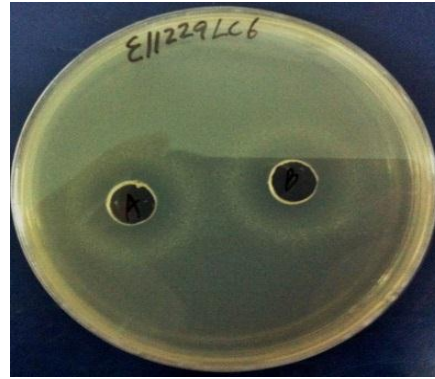


Şekil 4.3 Suşlarının antibiyotiklere karşı gösterdiği %duyarlılık ve dirençlilik oranları

4.4 LAB'ların Antimikrobiyel Aktiviteleri

LAB bakterilerin patojen mikroorganizmaları inhibe etme özelliği gıdalarda veya bağırsakta patojen olan 5 referans kültür (*E. coli* ATCC 11229, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus* RSKK 863, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 7644) kullanılarak, bölüm 3.2.7'de anlatıldığı gibi belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Tüm suşlar *E. coli* ATCC 11229 karşı antimikrobiyal etki gösterirken, en yüksek antimikrobiyal aktivite *Lac. lactis* 33 (4,5 mm) zon çapında gözlenmiştir. *Lac. lactis* 33'ün *E. coli* ATCC 11229'ın suşu üzerinde inhibisyonu (Resim 4.2) verilmiştir.



Resim 4.2 *Lac. lactis* 33'ün *E. coli* ATCC 11229 üzerinde antimikrobiyal etkisi

Lac. lactis subsp. *Lactis* 35, *Ent. faecium* 3 suşları dışında diğer suşların *E. coli* O157:H7 patojenine karşı antimikrobiyal etki gösterdiği gözlenmiştir.

Tüm suşların *B. cereus* RSKK 863, *S. enteritidis* ATCC 13076, *S. aureus* ATCC 25923, *L. monocytogenes* ATCC 7644 patojenlere karşı antimikrobiyal etki gösterdiği gözlenmiştir.

Suşların antimikrobiyal aktivitesi ile asit üretimleri arasında bir ilişki olup olmadığını araştırılarak, korelasyon testi yapılmıştır. Ancak, bu analizler sonucunda $p > 0.05$

olduğundan suşların antimikrobiyal aktivite ile asit üretimi arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilememiştir.

Çizelge 4.5 LAB bakterilerin test bakterileri üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çap değerleri (mm)

Bakteri suşları	<i>E. coli</i> ATCC 11229	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Bacillus cereus</i> RSKK 863	<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644
<i>Ent. durans</i> 51	2,4±0,2	2,1±0,2	3,6±0,1	2,8±0,2	3,3±0,0	2,2±0,3
<i>Ent. faecalis</i> 79	3,1±0,1	2,0±0,1	3,2±0,3	2,2±0,1	3,1±0,1	2,2±0,3
<i>Ent. faecium</i> 3	2,4±0,2	-	3,3±0,1	3,0±0,1	2,7±0,1	2,1±0,1
<i>Lac. lactis</i> 35	2,5±0,1	-	3,2±0,1	3,1±0,1	2,5±0,0	2,0±0,2
<i>Lac. lactis</i> 99	2,4±0,2	2,6±0,35	3,2±0,3	2,3±0,2	3,0±0,1	3,3±0,5
<i>Lac. lactis</i> 33	4,5±0,1	4,6±0,1	4,0±0,1	5,8±0,1	3,3±0,1	5,6±0,1
<i>Lac. lactis</i> 102	4,2±0,1	3,7±0,1	4,1±0,0	4,2±0,0	5,1±0,1	4,7±0,1
<i>Ped. acidilactici</i> DT9	5,4±0,1	2,7±0,1	4,1±0,1	4,6±0,0	3,2±0,1	5,6±0,1
<i>Ped. pentosaceus</i> P19	3,1±0,1	3,1±0,1	4,0±0,0	2,9±0,1	3,1±0,1	3,1±0,0
<i>Ped. pentosaceus</i> C24	4,4±0,1	2,5±0,1	4,8±0,1	3,2±0,1	2,7±0,1	3,0±0,0

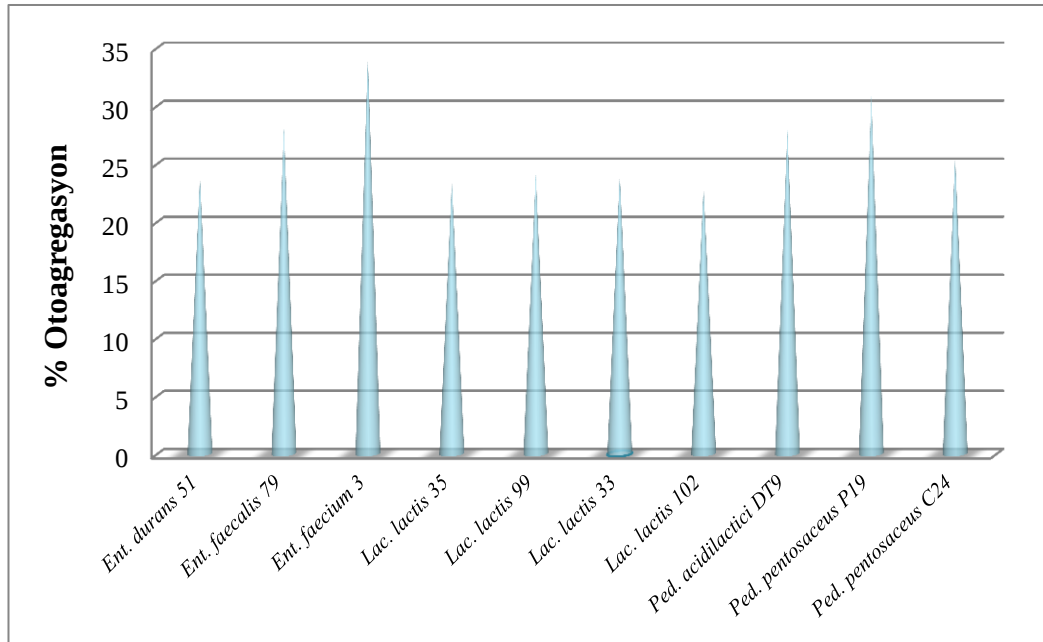
4.5 LAB Bakterilerin Otoagregasyon

LAB'ların otoagregasyon deneyleri Bölüm 3.2.6'de anlatıldığı şekilde yapılmış ve elde edilen otoagregasyon değerleri çizelge 4.6'de verilmiştir.

LAB bakterilerin otoagregasyon oranları (%23,0-%34,0) arasında bulunmuştur. LAB'ların otoagregasyon sonuçları değerlendirildiğinde, *Ent. faecium* 3 en yüksek (%34,0) otoagregasyon özelliği gösterirken, en düşük (%23,0) otoagregasyon *Lac. lactis* 102 suşunda tespit edilmiştir (Çizelge 4.6, Şekil 4.4). Genel olarak EPS üretimleri yüksek olan LAB'ların % otoagregasyon değerleri de yüksek bulunmuştur. Genel olarak bir değerlendirme yapıldığında, EPS üretimi yüksek olan suşların otoagregasyon yeteneklerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Suşların EPS üretimleri ve otoagregasyon arasında doğrusal bir korelasyon olduğu görülmüş ve $r = 0,6875$ olduğundan bu ilişki orta düzeyde anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

Çizelge 4.6 LAB bakterilerin % otoagregasyonları

Bakteriler	% Otoagregasyon
<i>Ent. durans</i> 51	24,0±2,0
<i>Ent. faecalis</i> 79	28,0±1,5
<i>Ent. faecium</i> 3	34,3±2,7
<i>Lac. lactis</i> 35	23,2±1,6
<i>Lac. lactis</i> 99	24,0±3,1
<i>Lac. lactis</i> 33	24,2±2,1
<i>Lac. lactis</i> 102	23,0±2,5
<i>Ped. acidilactici</i> DT9	27,9±1,3
<i>Ped. pentosaceus</i> P19	30,8±2,5
<i>Ped. pentosaceus</i> C24	25,7±1,0



Şekil 4.4 LAB bakterilerin % Otoagregasyonları

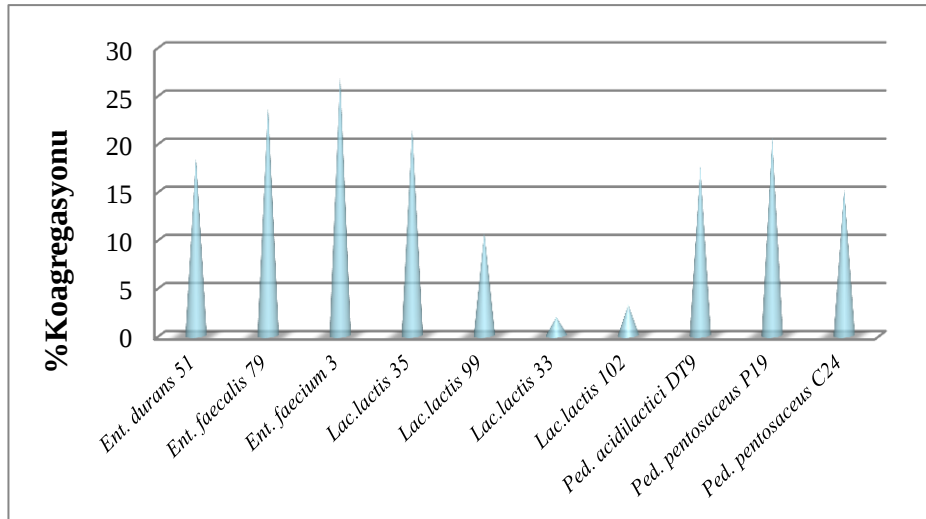
4.6 LAB Bakterilerin Koagregasyonu

LAB bakterilerin *E. coli* ATCC 11229 ile koagregasyonları (%1,92-%27,3) arasında bulunmuştur. *Ent. faecium* 3 test bakteri ile en yüksek (%27,3) oranında koagregasyon özelliği gösterirken, en düşük (%1,92) koagregasyon *Lac. lactis* 33 suşunda tespit

edilmiştir (Çizelge 4.7, Şekil 4.5). Genel olarak EPS üretimleri yüksek olan LAB' ların % koagregasyon değerleri de yüksek bulunmuştur. EPS üretimi (245 mg/l) yüksek olan *Ent. faecium* 3 suşunun *E. coli* ATCC 11229 ile koagregasyon %27,3 yüksek bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analizde, suşların EPS üretimleri ile koagregasyon ($r=0.4716$) arasında düşük düzeyde bir ilişki bulunmuştur ($p<0,05$).

Çizelge 4.7 LAB suşların *E. coli* ile % koagregasyonları

Bakteriler	%Koagregasyon
<i>Ent. durans</i> 51	18,3±1,4
<i>Ent. faecalis</i> 79	24,1±2,5
<i>Ent. faecium</i> 3	27,3±1,7
<i>Lac. lactis</i> 35	21,8±1,0
<i>Lac. lactis</i> 99	10,8±3,0
<i>Lac. lactis</i> 33	1,92±2,4
<i>Lac. lactis</i> 102	3,2±1,3
<i>Ped. acidilactici</i> DT9	17,0±2,8
<i>Ped. pentosaceus</i> P19	20,6±0,8
<i>Ped. pentosaceus</i> C24	15,3±1,1



Şekil 4.5 LAB bakterilerin *E. Coli* ATCC 11229 ile % Koagregasyonları

4.7 LAB Bakterilerin Farklı pH Değerlerine Toleransı

LAB suşlarının farklı pH değerlerinde yüzde canlılıkları spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.8). Ortamdaki asitlik oranı arttıkça, bakterilerin optikal yoğunluğunda ve canlılıklarında önemli oranda düşme meydana gelmiştir. Suşların genelinde pH 2’de hücre yoğunluğunun düştüğü ve yüzde hücre canlılıklarının azaldığı gözlenmiştir. pH 2’de suşların yüzde hücre canlılıkları (%0,05-%3,81) arasında bulunmuştur. Suşların, pH 2’de yüzde hücre canlılıkları (%0,05-%3,81) arasında gözlenmiştir. pH 2’de en düşük, %0.11 hücre canlılığı *Ped. lactici* DT19 suşunda, en yüksek canlı bakteri sayısı %3.81 *Ent. durans* 51 suşunda tespit edilmiştir. Suşların, pH 3’de yüzde canlılık oranı %1,88 ile %13,42 arasında bulunmuştur. pH 4’de canlı hücre sayısı pH 2 ve 3’e göre artış göstermiştir. pH 4’de canlı hücre oranları %21,87-%89,49 arasında belirlenmiştir. pH 5’de yüzde canlılık oranı (%91,16-%98,94) arasında bulunmuştur. Yüksek EPS üretimi gösteren *Ent. faecium* 3, *Ped. pentosaceus* P19 ve *Ent. faecalis* 79 suşların farklı pH değerlerinde dirençliliklerinin zayıf olduğu gözlenmiştir. Ancak,yapılan istatistiksel analizde, suşların EPS üretimleri ile asit dirençlilikleri arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığı tespit edilememiştir.

Çizelge 4.8 LAB suşlarının farklı pH değerlerine toleransı ve regresyon analiz sonuçları

Bakteriler	pH 6,8 (Kontrol)	pH 2,0		pH 3,0		pH 4,0		pH 5,0		Multiple R değeri	Signifi- cant F
	OD ₁	OD ₂	% Canlılık	OD ₂	% Canlılık	OD ₂	% Canlılık	OD ₂	% Canlılık		
<i>Ent. durans</i> 51	1,69±0,01	0,06±0,00	3,81	0,08±0,03	4,53	0,37±0,03	21,87	1,54±0,00	91,9	0,918	0,02
<i>Ent. faecalis</i> 79	1,91±0,03	0,02±0,02	0,89	0,22±0,00	11,29	1,49±0,01	78,43	1,82±0,00	95,59	0,899	0,03
<i>Ent. faecium</i> 3	1,96±0,00	0,03±0,01	1,41	0,19±0,01	9,77	1,51±0,00	78,96	1,80±0,01	94,2	0,898	0,03
<i>Lac. lactis</i> 35	1,7±0,02	0,03±0,02	1,82	0,03±0,00	1,88	1,47±0,02	86,35	1,68±0,02	98,94	0,860	0,06
<i>Lac. lactis</i> 99	1,74±0,00	0,04±0,00	2,36	0,05±0,02	3,04	1,52±0,13	87,19	1,69±0,00	96,84	0,861	0,06
<i>Lac. lactis</i> 33	1,66±0,01	0,02±0,00	1,14	0,04±0,00	2,41	0,75±0,02	45,19	1,52±0,01	91,16	0,941	0,01
<i>Lac. lactis</i> 102	1,87±0,00	0,03±0,01	1,88	0,09±0,00	4,82	1,48±0,00	79,27	1,78±0,00	95,45	0,887	0,04
<i>Ped.acidilactici</i> .DT9	1,89±0,02	0,00±0,00	0,05	0,16±0,06	8,66	1,49±0,02	78,56	1,79±0,03	93,88	0,898	0,03
<i>Ped. pentosaceus</i> P19	1,86±0,01	0,00±0,00	0,11	0,15±0,06	8,05	1,67±0,00	89,49	1,76±0,00	94,15	0,865	0,05
<i>Ped. pentosaceus</i> C24	1,92±0,00	0,07±0,02	3,71	0,26±0,03	13,42	1,44±0,16	75,35	1,87±0,04	97,6	0,905	0,03

1: Kontrol; çalışmada kullanılan besiyerinin pH' sı

2: Spektrofotometrede 600 nm de belirlenen yoğunluk (OD)

3: %Canlılık = (OD₁/OD₂)x100.

4.8 LAB Bakterilerin Farklı Safra Konsantrasyonlarına Toleransı

Bakterilerin farklı safra konsantrasyonlarına tolerans sonuçları (Çizelge 4.9)'de verilmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlardan, LAB bakterilerin safraya olan toleransı, safra oranına göre değişmekte olup, safranın %0,06, %0,15 ve %0,30 konsantrasyonlarında, artan konsantrasyona bağlı olarak bakterilerin gelişiminde azalma gözlenmiştir. LAB'ların %0,06 safra konsantrasyonunda %canlılık değerlerinin %92,03 ile %99,15 arasında olduğu tespit edilmiştir. %0,15 safra konsantrasyonunda %canlılık değerleri %78,36 ile %90,53 ve %0,30 safra konsantrasyonunda % canlılık değerleri %67,52 ile %74,65 arasında bulunmuştur. En yüksek yüzde inhibisyon %0,30 safra konsantrasyonunda gözlenmiştir (Çizelge 4.9). LAB suşları arasında safraya karşı en dirençli suşlar *Ped lactici* DT9 ve *Lac lactis* 35 olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan istatistiksel analizlerde, suşların EPS üretimleri ile farklı safra konsantrasyonlarına direnci arasındaki ilişkinin anlamlı olup olmadığı bulunamamıştır.

Çizelge 4.9 LAB'ların farklı safra konsantrasyonlarına toleransı

Bakteriler	%0,00 (Kontrol)	0,06%		0,15%		0,30%		Multiple R değeri	Significant F
	OD1	OD2	% Canlılık	OD2	% Canlılık	OD2	% Canlılık		
<i>Ent. durans</i> 51	1,88±0,01	1,80±0,00	96,01	1,59±0,00	84,51	1,27±0,02	67,52	0,999	0,02
<i>Ent. faecalis</i> 79	1,89±0,03	1,80±0,02	95,81	1,64±0,01	86,95	1,39±0,00	73,95	0,999	0,02
<i>Ent. faecium</i> 3	1,88±0,00	1,80±0,01	96,27	1,61±0,02	85,6	1,39±0,01	74,24	0,992	0,07
<i>Lac. lactis</i> 35	1,80±0,02	1,76±0,00	97,89	1,56±0,00	86,55	1,34±0,00	74,65	0,991	0,08
<i>Lac. lactis</i> 99	1,74±0,00	1,71±0,00	98,28	1,57±0,02	90,35	1,26±0,01	72,26	0,996	0,04
<i>Lac. lactis</i> 33	1,77±0,01	1,75±0,01	99,15	1,55±0,00	87,56	1,31±0,00	74,04	0,937	0,22
<i>Lac. lactis</i> 102	1,90±0,00	1,74±0,00	92,03	1,49±0,02	78,36	1,37±0,02	72,08	0,937	0,22
<i>Ped. acidilactici</i> DT9	1,94±0,02	1,86±0,02	97,34	1,69±0,00	88,46	1,39±0,00	72,59	0,999	0,01
<i>Ped. pentosaceus</i> P19	1,88±0,01	1,84±0,01	97,71	1,70±0,02	90,53	1,34±0,01	71,42	0,993	0,07
<i>Ped. pentosaceus</i> C24	1,94±0,00	1,88±0,00	96,76	1,68±0,00	86,26	1,45±0,00	74,37	0,994	0,06

OD1: Kontrol

OD2: Bakterilerin farklı safra ortamlarındaki yoğunlukları

% Canlılık: $OD_1/OD_2 \times 100$

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Fermente süt ürünleri, probiyotik bakterilerle zenginleştirilmiş fonksiyonel gıdalar olarak bilinmekte ve kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır (Saxelin vd. 2005). Probiyotiklerin insan sağlığında önemi alternatif tıp alanında koruyucu ve tedavi edici amaçla kullanılmaya başlanmıştır (Gorbach 2002).

Çalışma kapsamında *Enterococcus*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus* cisine ait 10 adet LAB suşları kullanılmıştır. Bu suşların bazı probiyotik özellikleri (Ekzopolisakkarit (EPS) üretimleri, kültürlerin farklı besiyerlerindeki yüzde asit üretimleri, antibiyotiklere karşı duyarlılıkları, antimikrobiyal aktivite, agregasyon (otoagregasyon ve koagregasyon) yetenekleri, farklı pH ve safra konsantrasyonlarına toleranslılıkları) araştırılmıştır. Elde edilen araştırma bulguları İstatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Probiyotik bakterilerin mideden geçip bağırsağa vardıklarında probiyotik özelliklerini gösterebilmelerindeki en büyük avantajlardan biri de ekzopolisakkarit (EPS) üretim kapasitelerine sahip olmalarıdır (Böke 2005). EPS'nin bakteriyi koruma özelliği yanında, bir çok etkenler ve antibiyotiklere karşı fiziksel bir koruyuculuk şeklinde de ortaya çıkmaktadır (Darılmaz vd. 2011a). EPS'ler hücre tanımlanması, yüzeye yapışma ve çeşitli ekosistemlerin kolonizasyonunu kolaylaştıran biyofilimlerin oluşturulmasında da rol oynarlar (Cerning vd. 1990). LAB'nin ürettiği EPS'lerin hücreye yapışma ve farklı ortamlarda hücrenin korunması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS'lerin antitümoral, bağışıklık sistemini düzenleyici ve kandaki kolesterol seviyelerini düşürücü etkilerinin olduğu da kanıtlanmıştır (Ruas-Madiedo vd. 2002). Probiyotik bakterilerin seleksiyonlarında EPS üretimlerinin yüksek olmasına önem verilmektedir.

Sema Ahi'nin tez çalışmasında *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* ve *Leuconostoc* cinslerine ait bazı suşlar kullanılarak EPS üretimleri ile antibiyotik dirençlilikleri arasındaki ilişki araştırılmış ve suşların EPS üretimleri 46,42 mg/l ile 208,88 mg/l arasında bulunmuştur. En yüksek (208,88 mg/l) EPS üretimi *Enterococcus fecalis* RT8 suşunda tespit edilirken, en düşük (46,42 mg/l) EPS miktarı

Enterococcus faecalis NCDO 581 kültüründe belirlenmiştir. *P. acidilactici* ped L 155,15 mg/l üretim gösterirken *P. pentosaceus* CHR-HANSEN 179,55 mg/l EPS üretimi göstermiştir.

Bu çalışmada, Tüm suşların EPS ürettiği ve üretim miktarlarının 127,30–245,00 mg/l arasında değiştiği belirlenmiştir. EPS üretimi en yüksek olan suş *Ent. faecium* 3 (245,00 mg/l)'dır. EPS üretimi en düşük olan suşun *Lac.lactis* 102 (127,30 mg/l) olduğu belirlenmiştir, sonuçlar yukarıda verilen verilerle destek kazanmıştır ve kullandığımız suşun yüksek EPS üretim yeteneğine sahip olduğunu kanıtlanmıştır.

Asit stresi gıda teknolojisinde kullanılan bakteriler için özel bir öneme sahiptir. Laktik asit bakterilerinin fermentasyonu ile üretilen süt ürünleri asitli olabilmektedir. Fermente edilmiş süt ürünlerinde bulunan probiyotik bakteriler laktik asit stresi ile karşılaşmaktadırlar. Fermente ürünlerin işlenmesi ve depolanması sırasında ürünün asitliğinden dolayı canlılığını kaybedebilmektedir. Bazı fermente ürünlerin yapısal özellikleri probiyotik bakterilerin depolanma, olgunlaşma ve sindirim sistemine taşınmasında koruyucu olabilmektedir. Probiyotik mikroorganizmaların mide boşluğuna vardığında, ilk engel olarak mide de bulunan hidroklorik asit düşük pH'nın engelidir. Düşük pH mikrobiyal proteinleri denatüre ederek bakterilerin canlılığını etkilemektedir. Bu nedenle probiyotik bakteriler bu engeli aşarak yararlı etkiler gösterebilmek için bağırsağa varması gerekmektedir (Jan 2001). Bilindiği gibi süt proteinleri bakteriler üzerinde koruyucu etki göstererek, midenin asidik ortamında bakterilerin canlı kalmalarını sağlamaktadır. Bu nedenden dolayı, probiyotik bakterilerin genellikle süt veya etli gıdalarla birlikte kullanıldığında daha etkili oldukları bildirilmiştir (Aktan vd. 1998). Bakterilerin mideden sonra ince bağırsakta canlı kalabilmeleri safra ve pankreatik enzimlere dirençliliğine bağlıdır. Bu nedenle mide-bağırsak sistemi koşullarını tolere edebilen türlerin belirlenmesi bir mikroorganizmanın probiyotik olarak seçilmesinde en önemli kriter olarak belirlenmiştir (Zarate 2000).

Bu çalışmada suşların TGE sıvı besi ortamındaki 24 saatlik kültürlerinin titre edilebilir yüzde asit miktarları %1.05-1.34 arasında tesbit edilmiştir. En düşük %1,05 (*Lac.lactis*

102) ve en yüksek %1,34 (*Ent. faecium* 3) suşlarında belirlenmiştir. Suşların, Skim Milk besi ortamında 24 saat inkübasyon sonunda %0.99-1.42 arasında asit ürettikleri bulunmuştur. en düşük %0,99 titre edilebilir yüzde asit miktarı *Lac.lactis* 33suşda ve en yüksek %1,42 asit üretimi *Ent. faecium* 3 kültüründe bulunmuştur. Araştırmada kullanılan diğer bakterilerin de yüksek asit üretim yeteneğinde olduğu belirlenmiştir. T-testi ile yapılan istatistiksel analizde suşların bu iki besiyerindeki yüzde asit üretimleri arasında doğrusal bir korelasyon olduğu görülmüş ve $r=0,6991$ olduğundan bu ilişki orta düzeyde anlamlıdır ($p<0,05$). Daha önce yapılan benzer çalışmalarda da *Enterococcus faecalis* RT121 (%2,06)suşunda yüksek yüzde asit üretimi bildirilmiştir (Sema Ahi 2011).

LAB bakterilerin probiyotik olarak kullanılabilmesinde antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi belirleyici bir özelliktir. Antibiyotik kullanımına bağlı gelişen ishaller, bozulan konak florasının düzeltilmesi gibi farklı amaçlarla kullanılan probiyotiklerin hastada tedavi amacı ile kullanılan antibiyotiklere dirençli olması gerekmektedir (Simadibrata vd. 2013).

Sema (2011) tarafından yapılan araştırmada, en yüksek EPS üretimi gösteren *E. faecalis* RT8 suşunun, protein sentezini inhibe eden tetrasiklin ve kloramfenikol, nükleik asit sentezini inhibe eden rifampisin ve hücre duvarı sentezini inhibe eden amfisilin antibiyotiklerine yüksek duyarlılık gösterdiği, yine hücre duvarı sentezini inhibe eden antibiyotik grubunda yer alan penisilin G antibiyotiğine ise orta dereceli duyarlı olduğu bildirilmiştir. *Enterococcus faecalis* RT8 suş protein sentezini inhibe eden gentamisin, streptomisin ve kanamisin, nükleik asit sentezini inhibe eden trimetoprim, siprofloksasin ve nalidiksik asid, hücre duvarı sentezini inhibe eden vankomisin antibiyotiklerine yüksek direnç göstermiştir.

Todorov vd. (2007)'nin insan vajinal salgısından izole ettiği *L. lactis* subsp. *Lactis* HV219 suşunun probiyotik özelliklerini incelediği çalışmada; HV219 suşunun gelişimini tetrasiklin, amikasin, streptomisin, neomisin, sulfonamidler ve nalidiksik asid inhibe edemezken; kloramfenikol, ofloksasin, trimetoprim, siprofloksasin, sefazolin ve vankomisinin inhibe ettiğini tespit etmiştir. Herreros vd. (2005) tarafından yapılan

başka bir çalışmada; Armada peynirinden izole edilen 9 adet *L. lactis* suşunun antibiyotik dirençlilikleri araştırılmıştır. Dilek Kaya Özdoğan(2011) tarafından yapılan çalışmada *L. lactis* subsp. *Lactis* suşunun 3'ünün amfisilin ve tetrasikline, 5'inin vankomisine, 6'sının kloramfenikol, kanamisin ve siprofloksine, 7'sinin rifampisine ve çalışılan tüm suşların ise trimetoprim karşı dirençli olduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada, farklı antibiyotiklerin (Gentamisin, Nitrofurantoin, Penisilin, Polimiksin ,Ofloksasin) LAB'lar üzerine inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Tüm bakterilerin Ofloksasin ve Polimiksin antibiyotiklerine karşı dirençli oldukları belirlenmiştir. Nükleik asit sentezi inhibitörü Ofloksasin (%100), Sitoplazmik zar sentezi inhibitörü Polimiksin (%100), antimikrobiyal Nitrofurantoin (%97) oranlarında yüksek dirençlilik gösterdikleri tespit edilmiştir. Ayrıca, suşların hücre duvar sentezini inhibe eden penisilin (%98), protein sentezi inhibitörü Gentamisin (%95) oranlarında duyarlı oldukları bulunmuştur, sonuçlar daha önce yapılan araştırmalara katkıda bulunmaktadır. Suşların antibiyotik duyarlılık ve EPS üretimleri arasındaki korelasyon testi yapılmıştır. Ancak, bu analizler sonucunda suşların antibiyotik duyarlılık ve EPS üretimleri arasındaki korelasyon anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).Literatürlerde ve bu çalışmada verildiği verilere göre *L. lactis* subsp. *Lactis* yada Enterekokların antibiyotik dirençlilikleri onların starter veya probiyotik olarak kullanımlarında büyük avantaj sağlayabileceği düşünülmektedir.

LAB bakterilerin antimikrobiyal aktivite özellikleri bir çok bilimsel araştırmalarda gösterilmiştir. bir araştırmada, LAB'lerle aynı kültürü paylaşan *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* ve *Salmonella* ssp. bakterilerin gelişmesinde ilk 12 saat artış gözlenirken, 48 saat inkübasyondan sonra pH' nin düşmesiyle birlikte patojen bakterilerin gelişiminde çok hızlı bir düşüşün olduğu rapor edilmiştir (Mainville vd. 2005). Probiyotik mikroorganizmaların en önemli özelliklerinden biri de, ortamda bulunan gıda kaynaklı patojenlerin ve kontaminant mikroorganizmaların gelişimini engellemeleri ve ölümlerine sebep olmalarıdır.

Hajkhani vd. (2007) tarafından yapılan çalışmada *Enterococcus*'ların bazı bağırsak patojeni ve gıda kontaminantı bakteriler üzerinde antagonisitik aktiviteleri incelenmiştir. Test bakterileri olarak *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* RSKK 863, *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* O157:H7, *S. enteritidis* ATCC 13076, *S. typhimurium* MU 80, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 kullanılmıştır. Toplam 44 adet *Enterococcus*'dan 16'sı *B. subtilis* üzerinde antimikrobiyal etki göstermezken, diğerleri 3,0 -8,0 mm arası zon çapında antimikrobiyal etki göstermiştir. *Enterococcus* suşlarının tümü *E. coli* ATCC 35218 üzerinde antimikrobiyal etki gösterirken, *E. faecium* RI 71 maksimum (8,6 mm) ve *E. faecium* RT 101 minimum (4,2 mm) zon çapında antagonistik aktivite göstermiştir. Suşlar *E. coli* O157:H7 üzerinde 2,4-6,6 mm arası zon çapında antimikrobiyal etki gösterirken, toplam 44 adet *Enterococcus* suşundan yalnız 6 suşun bu test bakterisi üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermediği gözlenmiştir; *S. enteritidis* ATCC 13076 üzerinde yalnız bir suş dışında maksimum (7,0 mm) ve minimum (2,8 mm) antimikrobiyal etki göstermişlerdir; *Enterococcus* suşlarının tümü *S. typhimurium* MU 80 üzerinde antimikrobiyal etki göstermiştir. *P. aeruginosa* ATCC 27853 üzerinde, yalnız *E. faecium* RI 58 (5,6 mm) ve *E. faecalis* RI 6 (4,8 mm) suşlarının antimikrobiyal etki gösterdikleri tespit edilmiştir. *S. aureus* ATCC 25923 üzerinde *E. faecium* suşları 3,0 -4,0mm arası zon çapında antimikrobiyal etki göstermiştir; *Enterococcus*'ların *L. monocytogenes* ATCC 7644 üzerinde her hangi bir antagonistik aktiviteleri bulunmamıştır. Çalışmada kullanılan toplam 44 adet *Enterococcus* suşlarından yalnız *E. faecium* RT 101'in *S. thermophilus* ATCC 14425 üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği gözlenmiştir.

Bu çalışmada LAB suşlarının bazı patojen (*E. coli* ATCC 11229, *E. coli* O157:H7, *B. Cereus* RSKK 863, *S. enteritidis* ATCC 13076, *S. aureus* ATCC 25923 ve *L. Monocytogenes* ATCC 7644) suşlar üzerinde antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Tüm suşlar *E. coli* ATCC 11229'e karşı antimikrobiyal etki gösterirken, test bakterisi üzerinde en yüksek antimikrobiyal aktivite *Lac. lactis* 33 (4,5 mm) zon çapında gözlenmiştir. *Lac. lactis* subsp. *Lactis* 35, *Ent. faecium* 3 suşları dışında, diğer suşların *E. coli* O157:H7 patojenine karşı antimikrobiyal etki gösterdiği gözlenmiştir. *B. cereus* RSKK 863, *S. enteritidis* ATCC 13076, *S. aureus* ATCC 25923, *L. monocytogenes*

ATCC 7644 patojenine karşı tüm LAB suşlarının antimikrobiyal etki gösterdiği tesbit edilmiştir.

Çalışmada elde edilen sonuçlara göre kültürlerin gıda kaynaklı hastalık ve bozulma etmeni bakterilere karşı güçlü bir antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğunu gözlenmiştir, antimikrobiyal etkinliği suşa göre değişkenlik gösterdiği düşünüldüğü suşların antimikrobiyal aktivitesi ile asit üretimleri arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmak için korelasyon testi yapılmıştır. Ancak, bu analizler sonucunda $p > 0.05$ olduğundan antimikrobiyal aktivite, asit üretimi arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilememiştir.

Bakterilerin agregasyon özelliğine sahip olması bulunduğu hücrelere tutunma ve dominant olarak kolonize olmasını sağlayacağından özellikle probiyotik açıdan önemli bir kriterdir. Laktik asit bakterileri agregasyon özelliği nedeniyle bulunduğu yüzeye ve birbirlerine yapışarak biyolojik bir bariyer oluştururlar (Vikova vd. 2008).

LAB'lerin agregasyon madde üretimleri mide-bağırsak sisteminde yaşama ve kolonize olabilme şanslarını arttırıp, bu bakterilerin bağırsağın peristaltik hareketlerinden dolayı elimine olmalarını engelleyerek, bağırsak ekosisteminde avantajlı olmalarını sağlamaktadır (Nikolic vd. 2008). Probiyotik olarak tanımlanmak istenen bakterinin; patojen olmaması, mide-bağırsak sistemi koşullarına toleranslı olması, bağırsak mukozasına adezyon ve rekabetle patojenlerin bağırsaktan uzaklaştırılması beklenen en önemli özellikleridir. Probiyotiklerin konak için yararlı etkiler gösterebilmesi için agregasyon ile yeterli yoğunlukta olmaları gerekmektedir. Bu nedenle probiyotiklerin agregasyon yetenekleri probiyotik seçiminde istenilen bir özellik olduğu bildirilmiştir. Probiyotiklerin patojen bakterilerle koagregasyonu bu bakterilere, bağırsakta tutunamayan ve koagregat olmayan türlere göre avantaj sağladığı yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. (Collado vd. 2008).

Bu çalışmada LAB'ların otoagregasyon oranları (%23,0 - %34,0) arasında bulunmuştur. Suşların, otoagregasyon sonuçları değerlendirildiğinde, *Ent. faecium* 3 en yüksek

(%34,0) oranında otoagregasyon özelliği gösterirken, en düşük (%23,0) otoagregasyon *Lac. lactis* 102 suşunda tespit edilmiştir. Genel olarak EPS üretimleri yüksek olan LAB'ların % otoagregasyon değerleri de yüksek bulunmuştur.

Suşların EPS üretimleri ile otoagregasyon arasında doğrusal bir korelasyon olduğu görülmüş ve $r = 0,6875$ olduğundan bu ilişki orta düzeyde anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

LAB bakterilerin *E. coli* ATCC 11229 ile koagregasyon sonuçları (%1,92-%27,3) arasında bulunmuştur. *Ent. faecium* 3 test bakteri ile en yüksek (%27,3) oranında koagregasyon özelliği gösterirken, en düşük (%1,92) koagregasyon *Lac. lactis* 33 suşunda tespit edilmiştir. Genel olarak EPS üretimleri yüksek olan LAB'ların test bakteri ile %koagregasyon değerleri yüksek bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analizde, suşların EPS üretimleri ile koagregasyon ($r = 0,4716$) arasında düşük düzeyde bir ilişki bulunmuştur ($p < 0,05$).

Mide sıvısının pH'sı 1 civarında olmasına rağmen, yemeklerden ve özellikle süt ürünlerinin tüketiminden sonra ortam pH'sı 3,0'e veya daha yüksek bir değere ulaşır. Bu nedenle, LAB'lerin pH 3'de canlılıklarını koruyabilmeleri probiyotik açıdan önem kazanmıştır (Mainville vd 2005). Mishra ve Prasad (2005)'in yaptıkları bir çalışmada, test edilen 7 adet LAB' suşlarından yalnız 3 suşun pH 2 veya 3'e dirençlilik gösterdiği rapor edilmiştir. Wanhlem ve ark. (2010)'nın yaptıkları çalışmada, 274 adet LAB'nin mide-bağırsak ortamına gösterdikleri tolerans, pH 3,0 de 37°C'de 4 saat inkübe edilerek incelenmiştir. Test edilen LAB'lerinden yalnız 10 adet suşda %50'nin üzerinde canlılık oranı tespit edilirken, pH 2,5'de aynı suşların canlılık oranlarında daha fazla azalma gösterilmiştir (Mainville vd. 2005).

Bu araştırmada, LAB suşlarının farklı (pH, 2,3,4,5) değerlerinde yüzde canlılıkları spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Ortamdaki asitlik oranı arttıkça, bakterilerin optikal yoğunluğunda ve canlılıklarında önemli oranda düşme meydana gelmiştir. Suşların, pH 2'de yüzde hücre canlılıkları (%0,05-%3,81) arasında gözlenmiştir. pH 2'de en düşük, %0.11 hücre canlılığı *Ped. lactici* DT19 suşunda, en yüksek canlı bakteri

sayısı %3.81 *Ent. durans* 51 suşunda tespit edilmiştir. Suşların, pH 3’de yüzde canlılık oranı %1,88 ile %13,42 arasında gözlenirken, en düşük canlı hücre sayısı *Lac. lactis* 35 (%1.88) suşunda, en yüksek (%13.42) canlı hücre sayısı *Ped. pentosaceus* C24 suşunda belirlenmiştir. pH 4’de canlı hücre sayısı pH 2 ve 3’e göre artış göstermiştir. pH 4’de canlı hücre oranları %21,87-%89,49 arasında belirlenmiştir. pH 5’de yüzde canlılık oranı (%91,16-%98,94) arasında bulunmuştur. Yüksek EPS üretimi gösteren *Ent. faecium* 3, *Ped. pentosaceus* P19 ve *Ent. faecalis* 79 suşların farklı pH değerlerinde dirençliliklerinin zayıf olduğu gözlenmiştir. Ancak,yapılan istatistiksel analizde, suşların EPS üretimleri ile asit dirençlilikleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Safra toleransı da probiyotiklerin seçiminde kullanılan önemli kriterlerden birdir. Safra yağları parçalayarak bunların bağırsaklardan emilimlerine yardımcı olur. Karaciğerden ince bağırsağa salgılanan safra, bakterilerin büyük oranda lipid ve yağ asidi içeren hücre membranlarına zarar vermek suretiyle inhibitör etki yapmaktadır (Dunne 1999). Bu sebeple probiyotik olarak kullanılacak bakterilerin bağırsaklarda fonksiyon gösterebilmeleri için safraya karşı dirençli olmaları gerekmektedir (Succi 2005). Bununla beraber, insan kullanımı için probiyotiklerin seçimindeki safra toleransı çalışmalarında %0,15 ve %0,30 konsantrasyonlarında safranin kullanılması önerilmektedir (Huang 2004). İnsandaki safra konsantrasyonuna yakın bir değer olmasından dolayı safraya dirençli olan suşları belirlemek için özellikle %0,30’lük safra konsantrasyonunun kritik bir değer olduğu bildirilmiştir (Erkkila 2000).

Bu çalışmada,suşların %0,06, %0,15 ve %0,30’luk safra konsantrasyonlarında safra dirençlilikleri ve % canlılık değerleri belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlardan, LAB suşlarının safraya olan toleransı, safra oranına göre değiştiği, safranin %0,06, %0,15 ve %0,30 konsantrasyonlarında, artan konsantrasyona bağlı olarak bakterilerin gelişiminde azalma gözlenmiştir. LAB’ lar ortamda bulunan safrayı belirli bir seviyeye kadar tolere edebilmektedir. Ancak, safra konsantrasyonu yükseldikçe ve özellikle %0,30 oranındaki safranin varlığında tüm suşların üreme yoğunluğunda azalma tespit edilmiştir. Suşların %canlılık değerleri %0,06, %0,15 ve %0,30 safra konsantrasyonunda sırası ile, %92,03 - %99,15, %78,36 - %90,53 ve %67,52 - %74,65

arasında bulunmuştur. En yüksek yüzde inhibisyon %0,30 safra konsantrasyonunda gözlenmiştir. Suşlar arasında safraya karşı en dirençli suşların *Ped. lactici* DT9 ve *Lac. lactis* 35 olduğu tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analizlerde, suşların EPS üretimleri ile farklı safra konsantrasyonlarına direnci arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığı bulunamamıştır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* suşlarının bazı patojen bakterilere karşı antimikrobiyal etki gösterdikleri, yüksek oranda EPS ürettikleri, mide-bağırsak sistemindeki zor şartlara dayanıklılık gösterdikleri ve kolonize olabilmelerinden dolayı yeni potansiyel probiyotik suş olarak aday olabilecekleri düşünülmüştür. Ayrıca *Ent. faecium* 3 , *Ped. pentosaceus* P19 , *Ent. faecalis* 79 üretmiş oldukları EPS ve gösterdikleri otoagregasyon ve koagregasyon yetenekleri aracılığıyla epitel yüzeylere daha kolay kolonize olup, patojenler üzerindeki inhibisyon etkileri sayesinde, epitel yüzeyinde *E. coli* ve *Salmonella*'lar gibi patojen mikroorganizmalar için biyolojik bir bariyer oluşturabilecekleri, Tüm bu suşların kullanılan bazı antibiyotiklere karşı dirençliliklerinden dolayı mide-bağırsak sisteminde daha iyi tutunmaları ve bulundukları ortamın normal mikroflorasını dengeleyerek, antibiyotik tedavisinden dolayı ortaya çıkan diyarenin tedavisinde yararlı olabilecekleri düşünülmektedir.

Pediococcus başta olmak üzere suşların probiyotik kullanım açısından önemli olan: asit, hidrojen peroksit ve EPS üretimleri, otoagregasyon ve koagregasyon gibi bazı özellikleri hakkında çok az sayıda araştırma bulunmaktadır. Dolayısıyla yaptığımız bu çalışma daha sonraki yapılacak araştırmalara katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Adnan, A.F.M. and Tan, I.K.P. 2007. Isolation of Lactic Acid Bacteria from Malaysian Foods and Assessment of The Isolates for Industrial Potential. *Bioresource Technology*, 98, 1380-1385.
- Ahi, S. 2011. Bazı laktik asit bakterilerinin Ekzopolisakkarit üretimi ile antibiyotik dirençliliklerinin araştırılması. Yüksek lisans tezi. Biyoloji, Gazi üniversitesi, Ankara.
- Akalın, H. E. 1994. Antibiyotiklere Direnç Gelişmesi ve Antibiyotik Kullanımı (H. E. AKALIN Editör). Klinik Uygulamalarda Antibiyotikler ve Diğer Antimikrobiyal İlaçlar. Güneş Kitabevi Limitet Şirketi. s. 38–39; Ankara.
- Akalın, S., Göncü, S. ve Senderya, S. 2000. Probiyotik süt ürünleri ve prebiyotikler, VI. Süt ve Süt Ürünleri Senpozyumu (Süt Mikrobiyolojisi ve katkı maddeler), Tebliğler Kitabı, Rebel Yayıncılık. 29-38.
- Aktan, N., Yücel, U. ve Kalkan, H. 1998. Turşu Teknolojisi . Ege Üniversitesi, Basımevi, Bornova- İzmir, 138.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dofour, E. and Chevallier, I. 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1. Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, 17, 454-461.
- Anonymous. 2007. Functional dairy drinks. Report. Bath, UK.
- Andrighetto, C., Knijff, E., Lombardi, A., Torriani, S., Vancanneyt, M., Kersters, K., Swing, J. and Dellaglio, F. 2001. Phenotypic and genetic diversity of *Enterococci* isolated from Italian cheeses , *J. Dairy Res*, 68, 303-316.
- Arda, M. 2006. Mikrobiyel Üremenin Kontrolü. Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Temel Mikrobiyoloji, 1.
- Arıcı, M., Bilgin, B., Sağdıç, O. and Özdemir, C. 2004. Some characteristics of *Lactobacillus* isolates from infant faeces. *Food Microbiology*, 21(1); 19-24.
- Arroyo, R., Martin, V., Maldonado, A., Jimenez, E. and Fernandez, L. 2010. Treatment of Infectious Mastitis during Lactation: Antibiotics versus Oral Administration of *Lactobacilli* Isolated from Breast Milk , *Clinical Infectious Diseases*, 50(12); 1551–1558.
- Aslım, B., Beyatlı, Y., Soran, H., Mercan, N., Durlu Özkaya, F., Yüksekdağ, Z. N. ve Ediz, N. 2005a. Bazı laktik asit bakterilerinin ekzopolisakkarit üretiminin belirlenmesi. Proje No: TBAG-2090 (101T129), 242 s.

- Axelsson, L.T.1998. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology, (S. SALMINEN and A. von WRIGHT, editörler), Lactic Acid Bacteria, Marcel Dekker, Inc, New York. pp, 1-72.
- Ayhan, K. 2000. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları; Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Yayınları, Armoni Matbaacılık, s. 37-80; Ankara.
- Batish, V.K., Roy, U. and Grover, S. 1997. Antifungal attributes of lactic acid bacteria-A review. Critical Reviews in Biotechnology, 17(3); 209-225.
- Badel, S., Bernardi , T. and Michaud, P. 2011. New perspectives for *Lactobacilli exopolysaccharides*, Biotechnology Advances, 29, 54–66.
- Beyatlı, Y. ve Aslım, B. 1997. Köy ve Kasaba Yoğurtlarından İzole Edilen *Streptococcus thermophilus* Suşlarının metabolik ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin incelenmesi .ÜKEM Dergisi, 20, 1-8.
- Beyatlı, Y. 1991. Metabolic Activity of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in ultrafiltration retentates. J. Biology of the Faculty of Science and Arts of Gazi University, 2, 331-341.
- Bhardwaj, A., Malik, R.K. and Chauhan, P. 2008. Functional and safety aspects of *Enterococci* in dairy foods, Indian J. Microbiol, 48, 317-325.
- Blandio, A., Al-Aseeri, M.E., Pandiella , S.S., Cantero, D. and Webb, C. 2003. Cereal-Based Fermented Foods and Beverages. Food Research International, 36, 527-543.
- Boris, S., Suarez, J. E. and Barbes, C. 1997. Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, vaginal isolate. Journal of Applied Microbiology, 83, 413-420.
- Böke, H. 2005. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türüne ait susların bazı probiyotik özelliklerinin belirlenmesi ve tutuklamanın bu özellikler üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara. 4-52.
- Casalta, E. and Montel, M.-C. 2008. Safety Assessment of Dairy Microorganisms: The *Lactococcus* genus. International Journal of Food Microbiology, 126, 271–273.
- Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M. and Desmazeaud, M.J. 1990. Comparison of exocellular polysaccharide production by thermophilic lactic acid bacteria. Sci. Des Aliments, 10, 443- 451.
- Champe, P. C. and Harvey, R. A. 1997. Biyokimya, Tokullugil, A. Dirican, M. and Ulukaya, E. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
- Chung, H.S., Kim Y.B., Chun S.L. and Ji, G.E. 1999. Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria. Int. J. Food Microbiol, 47, 25-32.

- Collado, M. C., Meriluoto, J. and Salminen, S. 2008. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*, 226(5); 1065–1073.
- Corthier, G. 2004. The Health Benefits of Probiotics, Danone Nutritopics. 29.
- Çadirci, B. H. And Çitak S. 2005. A Comparison of Two Methods Used for Measuring Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4(4); 237-241.
- Çon, A.H. ve Gökalp, H.Y. 2000 . Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyel Metabolitleri ve Etki Şekilleri . *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 30, 180-190.
- Darilmaz, D.O. and Beyatli, Y. 2012 . Investigating Hydrophobicity and the Effect of Exopolysaccharide on Aggregation Properties of Dairy Propionibacteria Isolated from Turkish Homemade Cheeses. *Journal of Food Protection*, 75(2); 359-365.
- Darilmaz, D.O. and Beyatli, Y. 2011b. Acid-bile, antibiotic resistance and inhibitory properties of propionibacteria isolated from Turkish traditional home-made cheeses. *Anaerobe*, 18, 122-127.
- Darilmaz, D., Aslım, B., Suludere, Z. and Akca, G. 2011a. Influence of gastrointestinal system conditions on adhesion of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains to caco-2 cells. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(5); 917-926.
- David, C. Lin. 2003. Probiotics As Functional Foods Nutritional in Clinical Practice, 18, 497.
- Del, Re B., Busetto, A., Vignola, G., Sgorbati, B. and Palenzona, D.L. 1998. Autoaggregation and adhesion ability in a *Bifidobacterium suis* strain, *Lett. Appl. Microbiol*, 27, 307-310.
- Delre, B., Sgorbati, B., Miglioli, M. and Palenzona, D. 2000. Adhesion autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett. Appl. Microbiol*, 31, 438-442.
- Demain, A.L. 1999. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms . *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 52, 455-463.
- Demirci, M. ve Gündüz, H. 1994. Süt Teknolojisi, El Kitabı, Hasad Yayıncılık, Ankar, 1-184.
- Dunne, C., Myrphy, L., Flynn, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., Quigley, E. M. M., O'sullivan, G. C., Shanahan, F. and Collins, J. K. 1999. Probiotics: From myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Anton Leeuw Journal*, 76, 279-292.

- El-Adaway, T. A. 2001. Optimum production, stability, partial purification and inhibitory spectrum of antimicrobial compounds produced by *Pediococcus pentosaceus* D1 . *Nahrung/Food*, 45, 118-124.
- Erdoğan, Ö.T., Çetin, Ö. ve Ergün, Ö. 2002. Fermente Sucuklardan İzole Edilen *Pediococcus pentosaceus* Suşlarının Bazı Metabolik ve Antimikrobiyel Aktiviteleri Üzerine Çalışmalar İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, 28, 249-254.
- Erkkila, S. and Petäjä, E. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science*, 55, 297-300.
- Facklam, R.R. and Teixeira, L.M. 1998. *Enterococcus* , Microbiology and Microbial Infection, 9 th ed., Vol. 2, Systematic Bacteriology, eds. Balows and Duerden, Oxford University Press, New York, 669-682.
- Fernandez, M.F., Boris, S. and Barbés, C. 2003. Probiotic properties of human *Lactobacilli* strains to be used in the gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol*, 94, 449-455.
- Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Muñoz-Quezada, S. and Gil, A. 2013. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*, 109, 35–50.
- Fortina, M.G., Ricci, G., Borgo, F., Manachini, P.L., Arends, K., Schiwon, K., Abajy, M.Y. and Grohmann, E. 2008. A survey on biotechnological potential and safety of the novel *Enterococcus* species of dairy origin, *E. italicus*. *Int. J. Food Microbiol*, 123, 204-211.
- Foulque Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. and De Vuyst, L. 2006. The role and application of *Enterococci* in food and health. *Int. J. Food Microbiol*, 106, 1-24.
- Franz, C.M.A.P., Holzaphel, W.H. and Stiles, M.E. 1999. *Enterococci* at the crossroad of Food Safety, *Int. J. of Food Microbiol*, 47, 1-24.
- Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H. and Holzaphel, W.H. 2003. *Enterococci* in Foods- A Countdown for Food Safety. *Int. J. Of Food Microbiol*, 88, 105-122.
- Fukuda, K., Shi, T., Nagami, K., Leo, F., Nakamura, T., Yasuda, K., Senda, A., Motoshima, H. and Urashima, T. 2010 . Effects of carbohydrate source on physicochemical properties of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus fermentum* TDS030603 in a chemically defined medium. *Carbohydrate Polymers*, 79(4); 1040–1045.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and Animals. *J. Appl. Bacteriol*, 66, 365-378.
- Furet, J.P., Queene, P. and Talliez, P . 2002. Quantification de bacteries lactiques par PCR quantitative. *Sci. Aliments*, 22, 33–44.

- Giraffa, G. 2002. *Enterococci* from Foods , FEMS Microbiology Reviews, 26,163-171.
- Giraffa, G. 2003. Functionality of *Enterococci* in Dairy Products . Int. J. of Food Microbiol, 88, 215- 222.
- Goldin, B.R. and Gorbach, S.L . 2008. Clinical indications for probiotics: an overview. Clinical Infectious diseases, 46(2); 96-100.
- Gorbach, S.L. 2002. Probiotics in the third millennium. Digest Liver Disease, 34(21); 2-7.
- Gueimonde, M. and Salminen, S. 2006. New methods for selecting and evaluating probiotics. Digestive and Liver Disease, 38, 242-247.
- Guslandi, M. 2003. Probiotics for Chronic Intestinal Disorders. Am. J. Gastroentol, 98, 520-521.
- Hajkhani, R., Beyatlı, Y. and Aslim, B. 2007. Antimicrobial activity of *enterococci* strains isolated from white cheese. International Journal of Dairy Technology, 60(2); 105–108.
- Halkman, A.K. 2005. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Başak Matbaacılık Ltd Şti, 246, 243-244.
- Hampikyan, H. ve Çolak, H. 2007. Nisin ve Gıdalardaki Antimikrobiyel Etkisi.TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni, 6(2); 142-147.
- Hayaloğlu, A.A. ve Erginkaya , Z. 2001. Gıda Endüstrisinde Kullanılan Laktik Asit Bakterileri, Gıda Teknolojisi Derneği, Yayın No: 23, Bizim Büro Basımevi Yayın Dağıtım sanayi Ticaret limited Şirketi, 26 s., Ankara.
- Hekmat, S. and Reid, G. 2006. Sensory Properties of Probiotic Yogurt is Comparable to Standard Yogurt.Nutrition Research, 26(4); 163-166.
- Herreros, M.A., Sandoval, H., Gonzalez, L., Castro, J.M., Fresno, J.M. and Tornadijo, M.E.2005. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteriaisolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). Food microbiology, 22, 455-459.
- Hugas, M., Garria, M. and Aymerich, M.T. 2003. Functionality of *Enterococci* in Meat Products , Int. J. of Food Microbiol, 88, 223-233.
- Huang, Y. and Adams, M.C. 2004. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. Int. J. Food Microbiol, 91, 253-260.
- Hummel, A., Holzapfel, W. H. and Franz, C. M. A. P. 2007. Characterisation and Transfer of Antibiotic Resistance Genes From *Enterococci* Isolated From Food . Systematic and Applied Microbiology, 30, 1-7.

- Hutkins, R.W. 2006. Microbiology and Technology of Fermented Foods, IFT Press, Blackwell Publishing, Oxford, UK, 473p.
- Hwanhlem, N., Watthanasakphuban, N., Riebroy, S., Benjakul, S. and Maneerat, S. 2010. Probiotic lactic acid bacteria from Kung-Som: isolation, screening, inhibition of pathogenic bacteria. International Journal of Food Science Technology, 45(3); 594-601.
- İnanç, N., Şahin, H. ve Çiçek. 2005. B. Probiyotik ve Prebiyotiklerin Sağlık Üzerine Etkileri. Erciyes Tıp Dergisi, 27(3); 122-127.
- Jacobsen, C.N., Rosenfeldt, N.V. and Hayford, A.E. et al. 1999. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. Appl. Environ. Microbiol, 65, 4949-4956.
- Jan, G., Leverrier, P., Pichereau, V. and Boyaval, P. 2001. Changes in protein synthesis and morphology during acid adaption of *Propionibacterium freudenreichii*, Appl. Environ. Microbiol, 67, 2029-2036.
- Karaca, H., Dinçer, E. ve Kıvanç, M. 2010. Metabolik Mühendisliğinde Laktik Asit Bakterileri, Akademik GıdaDerleme Makale / Review Paper, 8(1); 32-38.
- Kılıç, S. 2008. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri, Ege Üniversitesi Z.F. Yayını, No: 542, İzmir.
- Kıran, F. 2006. Hücre Duvarı Protein Profilleri ve Pilazmid İçeriklerine Göre Laktik Asit Bakterilerinin Moleküler Tanısı. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Klein, G. 2003. Taxonomy, Ecology and Antibiotic Resistance of *Enterococci* from Food and Gastro-Intestinal Tract , Int. J. of Food Microbiol, 88, 123-131.
- Kurt, Ş. ve Zorba, Ö. 2005. Bakteriyosinler ve Gıdalarda Kullanım Olanakları. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 16(1); 77-83.
- Kaya-Özdoğan, D. 2011. *Lactococcus lactis subsp. lactis* LL27 suşunun probiyotik özellikleri. Yüksek lisans tezi. Ankara üniversitesi, Biyoloji.
- Leroy, F. and De Vuyst, L. 2004. Lactic Acid Bacteria as Functional Starter Cultures for the Food Fermentation Industry. Trends in Food Science and Technology, 15, 67-78.
- Lim, H., Kim, S. and Lee, W. 2004. Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use . J. Vet. Sci, 5, 391- 395.
- López, M., Sáenz, Y., Rojo-Bezares, B., Martínez, S., del Campo, R., Ruiz-Larrea, F., Zarazaga, M. and Torres, C. 2009. Detection of vanA and vanB2-containing

- Enterococci* from food samples in Spain, including *Enterococcus faecium* strains of CC17 and the new singleton ST425. *Int. J. Food Microbiol*, 133, 172-178.
- Lu, Z., Breidt, F., Fleming, H.P. and Altermann, E. 2003. Isolation and Characterization of a *Lactobacillus plantarum* Bacteriophage, JL-1, From a Cucumber Fermentation. *Int. J. Food Microbiol*, 84, 225-235.
- Liasi, S. A., Azmi, T. I., Hassan, M. D., Shuhaimi, M., Rosfarizan, M. and Ariff, A. B. 2009. Antimicrobial activity and antibiotic sensitivity of three isolates of lactic acid bacteria from fermented fish product, Budu. *Malaysian Journal of Microbiology*, 5(1); 33-37.
- Mainville, I., Arcand, Y. and Farnworth, E. 2005. A dynamic model that stimulates the upper gastro-intestinal tract for the study of probiotics. *Int. J. Food Microbiol*, 99, 287-296.
- Makino, S., Ikegami, S., Kano, H., Sashihara, T., Sugano, H., Horiuchi, H., Saito, T. and Oda, M. 2006. Immunomodulatory effects of polysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *Dairy Science*, 89(8); 2873–2881.
- Mc, Groarty, J.A. 1994. Cel surface appandages of *Lactobacilli*. *FEMS Microbiol. Lett*, 124, 405-410.
- Meier, R. and Steuerwald, M. 2005. Place of probiotics. *Current Opinion in Critical Care*, 11(4); 318-325.
- Mercenier, A., Pavan, S. and Pot, B. 2002. Probiotics as Biotherapeutic Agents: Present Knowledge and Future Prospects. *Curr. Pharm. Design*, 8, 99-110.
- Mishra, V. and Prasad, D.N. 2005. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *Int. J. Food Microbiol*, 103, 109-115.
- Mıdık, F. 2011. Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi Yönünden İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi.
- Morelli, L. 2007. In vitro assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality. *Int. Dairy J*, 17, 1278–1283.
- Mozzi, F., Vaningelgem, F., Hebert, E., Van der Meulen, R., Foulquie Moreno, M.R., Font de Valdez, G. and De Vuyst, L. 2006. Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers. *Appl. Environ. Microbiol*, 72, 4431-4435.
- Mulholland, F. 1997. *Proteolytic Systems of Dairy Lactic Acid Bacteria*, (B.A. LAW, editor). *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, Blackie Academic & Professional Publishing, London, p: 299-318.

- Mucchetti, G. and Neviani, E. 2006. Microbiologia e tecnologia lattiero-casearia. Qualità e Sicurezza, Tecniche Nuove, Milano. Eds.
- Nikolic, M., Terzic-Vidojevic, A., Jovcic, B., Begovic, J., Golic, N. and Topisirovic, L. 2008. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese. *Int. J. Food Microbiol*, 122, 162-170.
- Ogier, J. C. and Serror, P. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus genus* . *Int. J. Food Microbiol*, 126, 291-301.
- Ong, L., Henriksson, A. and Shah, N. P. 2006. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid . *Int. Dairy J*, 16, 446-456.
- Öncül, O. 2002. Antibiyotikler 1.İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyumu, 31, 23-28.
- Prabhu, P., Srinivas, R. and Srinivasa, T.S. 2012. Probiotics for Prevention, *International Journal of Contemporary Dentistry*, 3(1); 68-72.
- Reid, G. and Bocking, A. 2003. The potantiel for probiotics to prevent bacterial vaginosis and preterm labor. *Am. J. Obstet. Gynecol*, 189, 1202-1208.
- Rehberger, L. and Glatz , B.A. 1998. Response of cultures of *Propionibacterium* to acid and low pH: tolerance and inhibition. *J. Food Protect*, 61(2); 211-216.
- Rinne, M., Kalliomaki, M., Salminen, S. and Isolauri, E. 2006. Probiotic Intervention in the First Months of Life: Short-Term Effects on Gastrointestinal Symptoms and Long-Term Effects on Gut Microbiota. *Pediatr Gastroenterol*, 43(2); 200-205.
- Ross, R.P., Fitzgerald, G., Collins, K. and Stanton, C. 2002 . Cheese delivering biocultures probiotic cheese. *Austr. J. Dairy Technol*, 57, 71-78.
- Rouhi, M., Sohrabvandi, S. and Mortazavian, A. M. 2013. Probiotic Fermented Sausage: Viability of Probiotic Microorganisms and Sensory Characteristics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 331–348.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. and Zoon, P. 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12, 163-171.
- Ruas-Madiedo, P. and De los,R.G. 2005. Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci*, 88, 843-856.
- Ruiz-Ruiz, C., Seivastava GK., Carranza D., Mata JA., Llamas I., Santamaria M., Quesada E. and Molina IJ. 2011. An exopolysaccharide produced by the novel halophilic bacterium *Halomonas stenophilla* strain B100 selectively induces

- apoptosis in human T leukaemia cells, *Appl Microbiol Biotechnol* Jan, 89(2); 345-55.
- Saaavedra, L., Taranto, M.P., Sesma, F. and Valdez, G.F. 2003. Homemade Traditional Cheeses for The Isolation of Probiotic *Enterococcus faecium* Strains. *Int. J. Food Microbiol*, 88, 241-245.
- Sabir, F., Beyatli, Y., Cokmus, C. and Darilmaz, D. 2010. Assessment of potential probiotic properties of *Lactobacillus spp.*, *Lactococcus spp.* and *Pediococcus spp.* strains isolated from kefir. *Journal of Food Science*, 75(9); 568-573.
- Sanders, M.E. 1999. Probiotics, *Food Technol*, 53, 67-77.
- Sağlam, Ö. F. 2000. Türk Gıda Mevzuatı. Semih Ofset, Ankara.
- Salminen, S., Ouwehand, A., Benno., and Wright, A. 2004. Lactic Acid Bacteria, microbial and Functional Aspects, *Food Sci. & Technol*, 3, 1-53.
- Sanchez, J., Basanta, A., Gómez-Sala, B., Herranz, L.M., Cintas, C. and Hernández, P.E. 2007. Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic *Enterococci* isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Int. J. Food Microbiol*, 117, 295-305.
- Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M.D., Rea, M.C., Lombardi, A., Cogan, T.M., Kalantzopoulos, G. and Tsakalidou, E. 2001. Biochemical properties of *Enterococci* relevant to their technological performance, *Int. Dairy J*, 11, 621-647.
- Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T. and de Vos, W. 2005. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Curr. Opin. Biotechnol*, 16, 1-8.
- Senok, A.C., Ismaeel, A. Y. and Botta, G. A. 2005. Probiotics: facts and myths. *Clinical Microbiology Infect*, 11, 958-966.
- Settanni, L. and Moschetti, G. 2010. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27, 691-697.
- Simadibrata, M., Ndraha, S., Tedjasaputra, R., Syam, A.F., Santi, A.F.A. and Rani, A. 2013. Revealing the effect of probiotic combination: *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus acidophilus* (Lacidofil®) on acute diarrhea in adult patients. *Journal of Clinical Medicine and Research*, 5(2); 23-28.
- Simpson, W.J. and Taguchi, H. 1995. The Genus *Pediococcus* with Notes on the Genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*, (B.J.B. WOOD and W.H. HOLZAPFEL, editors), *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Vol. 2, Blackie Academic & Professional, London, p. 125-172.

- Shah, N. P. 2001. Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food Technolog*, 55(11); 46-53.
- Stiles, M.E. and Holzapfel , W.H. 1997. Lactic Acid Bacteria of Foods and Their Current Taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36, 1-29.
- Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Sorrentino, E., Grazia, L., Pacifino, F. and Coppola, R. 2005.
- Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolates from Parmigiano Reggiano cheese. *Fems Microbiol. Lett*, 244, 129-137.
- Tangüler, H. 2010. Şalgam Suyu Üretiminde Etkili Olan Laktik Asit Bakterilerinin Belirlenmesi ve Şalgam Suyu Üretim Tekniğinin Geliştirilmesi, Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 341-352.
- Tekinşen, O.C. ve Atasever, M. 1994. Süt ürünlerinde starter kültür , Selçuk Üni. Veterinerlik Fak. No:150, Konya.
- Todorov, S.D., Botes, M., Danova, S.T. and Dicks, L.M.T. 2007. Probiotic properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* HV219, isolated from human vaginal secretions. *J.Appl. Microbiol*, 103, 629-639.
- Torino, M., Taranto, M., Sesma, F. and Valdez, G. 2001. Heterofermentative pattern and exopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* 15807 in response to environmental pH. *Journal Appl Microbiol*, 91(5); 846-852.
- Turantaş, F. 1998. Fermantasyonda Rol Oynayan Mikroorganizmalar, (A., ÜNLÜTÜRK ve F., TURANTAŞ, editörler), Gıda Mikrobiyolojisi, Mengi Tan Basımevi, Çınarlı, İzmir, s. 433-453.
- Vasiljevic, T. and Shah, N.P. 2008. Probiotics-from Metchnikoff to bioactives . *Int. Dairy J*, 18, 714-728.
- Van, Niel, E.W.J., Hofvendahl, K. and Hahn-Hagerdal, B. 2002. Formation and conversion of oxygen metabolites by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol*, 68(9); 4350–4356.
- Vernazza, C. L., Gibson, G. R. and Rastal, R. A. 2005. In vitro fermentation of chitosan derivatives by mixed cultures of human fecal bacteria. *Carbohydr. Polym*, 60, 539-545.
- Vikova, E., Rada, V., Ova, S. and Killer, J. 2008. Auto-Aggregation and Co-Aggregation Ability in Bifidobacteria and Clostridia. *Folia Microbial*, 53(3); 263-269.
- Vuyst, L. D., Falony, G. and Leroy, F. 2008. Probiotics in fermented sausages. *Meat Science*, 80, 75–78.
- Welman, A. D. and Maddox, IS. 2003b. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*, 21(6); 269-274.

- Yang, Z. 2000. Antimicrobial Compounds and Extracellular Polysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria: Structure and Properties. Academic Dissertation. Department of food technology. University of Helsinki. 61.
- Yılsay, T.Ö. ve Kurdal, E. 2000. Probiyotik süt ürünlerinin beslenme ve sağlık üzerinde etkisi. Süt ve Süt Ürünleri Senpozyumu (Süt Mikrobiyolojisi ve katkı maddeler), 279-286, Tekirdağ.
- Yoon, M.Y., Kim, Y.J. and Hwang, H.J. 2008. Properties and safety aspects of *Enterococcus faecium* strains isolated from Chungkukjang, a fermented soy product. LWT, 41, 925-933.
- Yuksekdag, Z. and Aslim, B. 2008. Influence of different carbon sources on exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* (B3, G12) and *Streptococcus thermophilus* (W22). Brazilian Archives of Biology and Technology, 51(3); 581-585.
- Zarate, G., Morata De Ambrosini, V. I., Chaia, A. P. and González, N.S. 2002a. Some factors affecting the adherence of *Propionibacterium acidipropionici* CRL 1198 to intestinal epithelial cells. Can. J. Microbiol, 48, 449-457.
- Zarate, G., Pèrez Chaia, A., González, S. and Oliver, G. 2000. Viability and β -galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids. J. Food Protect, 63, 1214-1221.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Maimaiti AKEPAER
Doğum Yeri : XINJIANG
Doğum Tarihi :19.03.1984
Medeni Hali : Master
Yabancı Dili : İngilizce, Türkçe, Çince.

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : BAGANG 3.OTURA (1998-2001)
Lisans : Xinjiang Üniversite, Fen Bilimleri, Biyoloji
Anabilim Dalı (2001-2006)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversite, Fen Bilimleri, Biyoloji Anabilim Dalı. (Kasım
2011-Ocak 2015)