



**PROBİYOTİK BAKTERİ İZOLATININ  
ANTI-DİYABETİK POTANSİYELİNİN**

**ARAŞTIRILMASI**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Aslı MERCAN**

**Eskişehir 2020**

**PROBİYOTİK BAKTERİ İZOLATININ ANTI-DİYABETİK  
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Aslı MERCAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Merih KIVANÇ**

**(İkinci Danışman: Doç. Dr. Güzde AYDOĞAN KILIÇ)**

**Eskişehir**

**Anadolu Üniversitesi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Ocak 2020**

*Bu tez çalışması BAP komisyonunca kabul edilen 1803F060 no.lu proje ve TÜBİTAK - 2210-C burs programı kapsamında desteklenmiştir.*

## **JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI**

Aslı MERCAN'ın "Probiyotik Bakteri İzolatının Anti-diyabetik Özelliğinin Araştırılması" başlıklı tezi 22/01/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans olarak kabul edilmiştir.

### **Jüri Üyeleri**

Üye (Tez Danışmanı)

Üye

Üye

### **Unvanı Adı Soyadı**

: Prof. Dr. Merih KIVANÇ

: Dr. Öğr. Üyesi Volkan KILIÇ

: Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU

### **İmza**

Prof. Dr. Murat TANIŞLI

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

## **FİNAL APPROVAL FOR THESIS**

This thesis titled ‘‘Investigation Of Antidiabetic Potential Of Probiotic Bacteria Isolate’’ has been prepared and submitted by Aslı MERCAN in ‘‘Anadolu University Directive on Graduate Education and Examination’’ for the Degree of Master of Science in Biology Department has been examined and approved on 22/01/2020.

### **Committee Members**

### **Title, Name and Surname**

### **Signature**

Member (Supervisor)

: Prof. Dr. Merih KIVANÇ

Member

: Dr. Öğr. Üyesi Volkan KILIÇ

Member

: Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU

Prof. Dr. Murat TANIŞLI

Director of Institute

## ÖZET

### PROBİYOTİK BAKTERİ İZOLATININ ANTI-DİYABETİK POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI

Aslı MERCAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ocak 2020

Danışman: Prof. Dr. Merih KIVANÇ

(İkinci Danışman: Doç. Dr. Gözde AYDOĞAN KILIÇ)

Probiyotikler antidiyabetik etki ve antioksidan özellikler nedeniyle diyabet için alternatif terapötik ajan olarak düşünülmektedir. Bununla birlikte probiyotiklerin antidiyabetik etkilerinin mekanizması henüz tam olarak anlaşılammıştır. Bu nedenle farklı izolatların antidiyabetik etkilerinin ortaya koyulması ve sonrasında yapılacak çalışmalarda bu etkilerin mekanizmalarının detaylı olarak incelenmesi önem taşımaktadır.

Bu çalışmada daha önceden çalışılmış olan laktik asit bakterilerinin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlere tabi tutularak ve moleküler düzeyde tanımlanması yapılmıştır. Bunun yanında  $\beta$ -galaktosidaz, asitlik direnci, glikosidaz, kolesterol ve lipit metabolizmasına üzerine etkisine bakılmıştır.

Probiyotik özelliğinin yüksek olmasının yanında glikosidaz aktivitesinin yüksek olan izolat seçilmiştir. Bu hususlar göz önüne alınarak daha önce yapılan çeşitli araştırmalarda izole edilen laktik asit bakterilerinin ön tarama yöntemlerinde yüksek etkiye sahip olan bir izolatın antidiyabetik etkisinin olup olmadığının belirlenmiştir. Tip 1 modeli oluşturulan ratlara seçilen laktik asit bakterisi verilerek diyabet üzerine etkisi incelenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Probiyotik, diyabet, laktik asit bakteri, glikosidaz

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF ANTIDIABETIC POTENTIAL OF PROBIOTIC BACTERIA ISOLATE

Aslı MERCAN

Department of Biology

Programme in Basic and Industrial Microbiology

Anadolu University, Graduate School of Science, January 2020

Supervisor: Prof. Dr. Merih KIVANÇ

(Co-Supervisor: Doç. Dr. Güzde AYDOĞAN KILIÇ)

Probiotics are considered as an alternative therapeutic agent for diabetes due to their antidiabetic effect and antioxidant properties. However, the mechanism of the antidiabetic effects of probiotics has not yet been fully understood. For this reason, it is important to determine the antidiabetic effects of different isolates and to investigate the mechanisms of these effects in detail in future studies.

However, the mechanism of the antidiabetic effects of probiotics has not yet been fully understood. For this reason, it is important to determine the antidiabetic effects of different isolates and to investigate the mechanisms of these effects in detail in future studies.

In addition to high probiotic properties, isolates with high glycosidase activity were selected. Considering these issues, it has been determined whether or not an isolate with high effect on the pre-screening methods of isolated lactic acid bacteria has antidiabetic effect. Lactic acid bacteria were given to rats of type 1 model and their effect on diabetes was investigated.

**Keywords:** Probiotic, diabetes, lactic acid bacteria, cholesterol, glucosidase

## TEŞEKKÜR

Tezimin tüm aşamalarında danışmanlık yapan, bilimsel katkı ve desteğini esirgemeyen, her anlamda yanımda olan tez danışmanım ve değerli hocam Prof. Dr. Merih KIVANÇ 'a,

Hayvan deney sürecinde danışmanlık eden hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Volkan KILIÇ, Doç. Dr. Gözde AYDOĞAN KILIÇ'a ve tüm hayvan deneyi sürecinde hep yanımda olup yardımını esirgemeyen değerli arkadaşım Banu Büşr AKGÜL'e

Laboratuvar çalışmalarım sırasında destekleyen ve yardımcı olan tüm arkadaşlarıma,

Tez çalışmam süresince maddi manevi desteklerini esirgemeyen değerli aileme ve hayatımın her alanında yardımcı olduğu gibi tez çalışma sürecimde de sabrını ve desteğini esirgemeyen sevgili nişanlım Orhan KOCABAŞ'a sonsuz teşekkür ederim.

Aslı MERCAN

22/01/2020

### **ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ**

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

(İmza)

Aslı MERCAN

22/01/2020

## **STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES**

I hereby truthfully declare that this thesis is an original work prepared by me; that I have behaved in accordance with the scientific ethical principles and rules throughout the stages of preparation, data collection, analysis and presentation of my work; that I have cited the sources of all the data and information that could be obtained within the scope of this study, and included these sources in the references section; and that this study has been scanned for plagiarism with “scientific plagiarism detection program” used by Anadolu University, and that “it does not have any plagiarism” whatsoever. I also declare that, if a case contrary to my declaration is detected in my work at any time, I hereby express my consent to all the ethical and legal consequences that are involved.

(Signature)

Aslı MERCAN

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI .....	ii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
GÖRSELLER DİZİNİ .....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ.....	17
1.1. Probiyotik.....	19
1.1.1. Probiyotiklerin Tanımı ve Tarihçesi.....	19
1.1.2. Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar .....	20
1.1.3. Laktik Asit Bakterileri .....	21
1.1.4. Probiyotiklerde Aranan Özellikler .....	23
1.1.5. Probiyotik Bakterilerin Sağlıktaki Rolü ve Etki Mekanizması .....	23
1.2. Diyabet .....	26
1.2.1. Diyabetin Epidemiyolojisi.....	26
1.2.2. Tip 1 Diyabet.....	26
1.2.3. Probiyotiklerin Diyabet Üzerine Etkisi .....	28
1.2.4. Kan Glukoz Kontrol Hedefleri: Güncel terapötik stratejiler.....	28
1.2.5. Diyabet İçin Alternatif Tedaviler.....	29

<b>2. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	<b>30</b>
<b>2.1. Materyal</b> .....	<b>30</b>
<b>2.1.1. Bakteriler</b> .....	<b>30</b>
<b>2.1.2. Patojen Bakteriler</b> .....	<b>30</b>
<b>2.1.3. Besiyerleri</b> .....	<b>30</b>
<b>2.1.4. Kimyasallar ve çözeltiler</b> .....	<b>32</b>
<b>2.2. Yöntem</b> .....	<b>34</b>
<b>2.2.1. Laktik asit bakterilerinin incelenmesi</b> .....	<b>34</b>
<b>2.2.2. pH dirençliliği</b> .....	<b>35</b>
<b>2.2.3. Laktik asit bakterilerinin gastrointestinal şartlara direnci</b> .....	<b>35</b>
<b>2.2.4. Laktik asit bakterilerinin agregasyon aktiviteleri</b> .....	<b>36</b>
<b>2.2.5. Laktik asit bakterilerinin hücre-yüzey hidrofobisitesi</b> .....	<b>37</b>
<b>2.2.6. Laktik asit üretimi</b> .....	<b>37</b>
<b>2.2.7. Laktik asit bakterilerinin süpernatantlarının antibakteriyal aktivitelerinin belirlenmesi</b> .....	<b>37</b>
<b>2.2.8. Lipolitik Aktivite</b> .....	<b>38</b>
<b>2.2.9. <math>\beta</math>-galaktosidaz aktivitesi</b> .....	<b>38</b>
<b>2.2.10. Kolesterol Asimilasyonu</b> .....	<b>39</b>
<b>2.2.11. Glukosidaz inhibisyonunun ölçümü</b> .....	<b>39</b>
<b>2.2.12. Hayvan deneyleri</b> .....	<b>40</b>
<b>3. BULGULAR</b> .....	<b>43</b>
<b>3.1. Laktik Asit Bakterilerinin İncelenmesi</b> .....	<b>43</b>
<b>3.2. pH dirençliliği belirlenmesi</b> .....	<b>44</b>
<b>3.3. LAB' ların gastrointestinal şartlara direncinin belirlenmesi</b> .....	<b>48</b>
<b>3.3.1. Safra tuzu (oxgall) direncinin belirlenmesi</b> .....	<b>48</b>

3.4. Laktik asit bakterilerinin agregasyon aktivitelerinin belirlenmesi .....	52
3.4.1. Otoagregasyon aktivitesinin belirlenmesi .....	52
3.4.2. Koagregasyon aktivitesinin belirlenmesi .....	53
3.5. Laktik asit bakterilerinin hücre-yüzey hidrofobisitesi .....	54
3.6. Laktik asit bakterilerinin laktik asit üretiminin belirlenmesi .....	56
3.7. LAB'ların süpernatantlarının antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi.....	57
3.8. Lipolitik aktivite .....	59
3.9. $\beta$ -galaktosidaz aktivitesinin belirlenmesi .....	59
3.10. Kolesterol asimilasyonun belirlenmesi .....	61
3.11. Glikosidaz aktivitesinin belirlenmesi.....	63
3.12. Hayvan deneyleri sonuçları.....	66
3.12.1. Glikoz tolerans testi sonucu .....	67
3.12.2. Glukoz ölçümleri, su ve yem tüketimleri.....	68
3.12.3. Dışkıda ve duodenumda bakteri sayımı sonucu .....	70
3.12.4. Kan parapetreleri sonuçları .....	75
4. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	78
KAYNAKÇA.....	86
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	

## TABLolar DİZİNİ

### Sayfa

<b>Tablo 1.1.</b> Probiyotik mikroorganizmalar .....	21
<b>Tablo 1.2.</b> Probiyotik Etki Mekanizmaları.....	24
<b>Tablo 3.1.</b> İzolatların incelenmesi .....	43
<b>Tablo 3.2.</b> pH dirençliliğinin belirlenmesi .....	45
<b>Tablo 3.3.</b> LAB' nin E.coli ve S.aures ile yüzde koagregasyon aktiviteleri .....	53
<b>Tablo 3.4.</b> Laktik asit üretimi (%).....	56
<b>Tablo 3.5.</b> LAB' ların antibakteriyal aktivitelerinin zon çapları (mm).....	57
<b>Tablo 3.7.</b> LAB' ların kolesterol asimilasyon sonuçları(%) .....	61
<b>Tablo 3.8.</b> Dışkıda İlk bakteri sayımları(kob/gr) .....	71
<b>Tablo 3.9.</b> Probiyotik verildikten sonra 1. haftadaki bakteri sayımı(kob/gr).....	71
<b>Tablo 3.10.</b> Probiyotik verildikten sonra 2. haftadaki bakteri sayım (kob/gr).....	72
<b>Tablo 3.11.</b> Probiyotik verildikten sonra 3. haftadaki bakteri sayımı (kob/gr).....	72
<b>Tablo 3.12.</b> Probiyotik verildikten sonra 4. haftadaki bakteri sayımı (kob/gr).....	73
<b>Tablo 3.13.</b> Duodenumdan bakteri sayımı (kob/ml) .....	74
<b>Tablo 3.14.</b> Serumda insulin ölçümleri (pg/ml) .....	75
<b>Tablo 3.15.</b> HbA1c ölçüm sonucu.....	76

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 3.1. M17 broth besiyerinde %0,3 safra tuzu (oxgall) 630 nm değerleri.....	48
Şekil 3.2. MRS broth besiyerinde %0,3 safra tuzu (oxgall) 630 nm değerleri.....	48
Şekil 3.3. M17 broth besiyerinde %0,6 safra tuzu (oxgall) 630 nm değerleri.....	49
Şekil 3.4. MRS broth besiyerinde %0,6 safra tuzu (oxgall) 630 nm değerleri.....	49
Şekil 3.5. M17 broth besiyerinde %1,25 safra tuzu (oxgall) 630 nm değerleri.....	50
Şekil 3.6. MRS broth besiyerinde %1,25 safra tuzu (oxgall) 630 nm değerleri.....	50
Şekil 3.7. M17 broth besiyerinde %2,5 safra tuzu (oxgall) 630 nm değerleri.....	51
Şekil 3.8. MRS broth besiyerinde %2,5 safra tuzu (oxgall) 630 nm değerleri.....	51
Şekil 3.9. M17' de gelişen LAB' ların % otoagregasyon aktivite sonuçları .....	52
Şekil 3.10. MRS' de gelişen LAB' ların % otoagregasyon aktivite sonuçları .....	52
Şekil 3.11. LAB'ların kloroform çözücüsüne affinite yüzdesi (% hidrofobisite) .....	55
Şekil 3.12. M17 brothta LAB'ların $\beta$ -galaktosidaz aktivite sonuçları .....	60
Şekil 3.13. MRS brothta LAB'ların $\beta$ -galaktosidaz aktivite sonuçları.....	61
Şekil 3.14. Süpernatanın 30. dakikadaki % inhibisyonu .....	63
Şekil 3.15. Süpernatanın 60. dakikaki % inhibisyonu.....	64
Şekil 3.16. Süpernatanın 90. dakikaki % inhibisyonu.....	64
Şekil 3.17. Bakteri hücre lizatının 30. dakikaki % inhibisyonu .....	65
Şekil 3.18. Bakteri hücre lizatının 60. dakikaki % inhibisyonu .....	65
Şekil 3.19. Bakteri hücre lizatının 90. dakikaki % inhibisyonu .....	66
Şekil 3.20. Hayvanların vucüt ağırlıkları.....	67

**Sayfa**

<b>Şekil 3.21.</b> Glikoz tolerans testi sonucu (mg/dl). .....	68
<b>Şekil 3.22.</b> Haftalık glukoz ölçümleri (mg/dl).....	69
<b>Şekil 3.23.</b> Hayvanların tükettiği su miktarı.....	69
<b>Şekil 3.24.</b> Hayvanların tükettiği yem miktarı .....	70



## GÖRSELLER DİZİNİ

### Sayfa

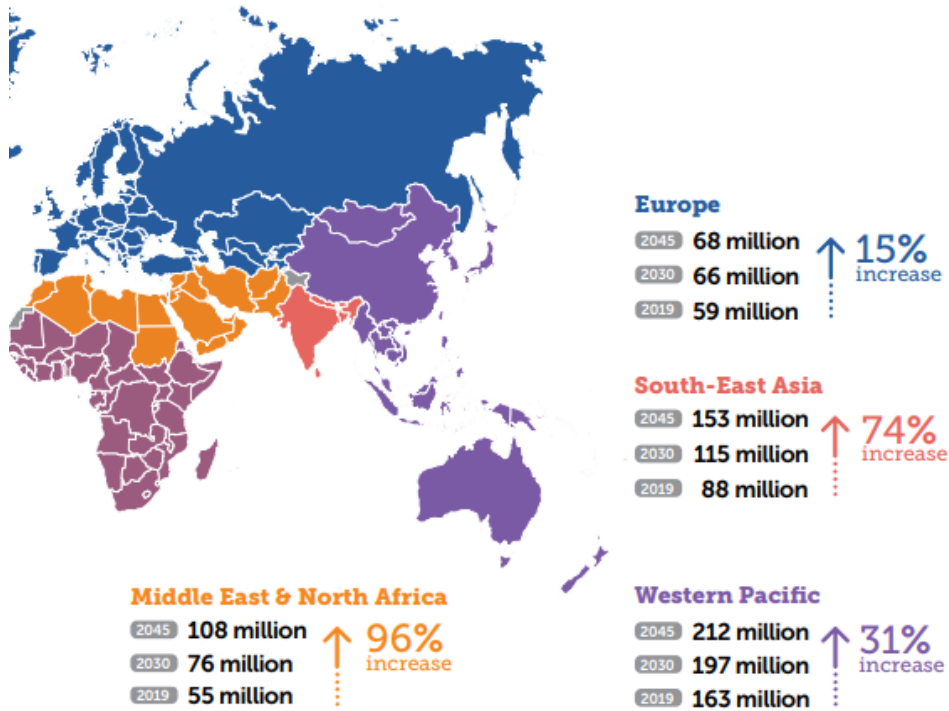
<b>Görsel 1.1.</b> 2019, 2030 ve 2045'te (20–79 yaş) dünya çapında diyabetli kişi sayısı....	17
<b>Görsel 1.2.</b> Tip 1 diyabetin semptomları.....	27
<b>Görsel 2.1.</b> Hayvanların kafes düzeni .....	40
<b>Görsel 2.2.</b> Hayvanlara gavaj uygulaması.....	42
<b>Görsel 3.1.</b> Laktik asit bakterilerinin kloroforma karşı hidrofobisitesi.....	54
<b>Görsel 3.2.</b> Titrasyon işlemindeki renk değişimi .....	57
<b>Görsel 3.3.</b> UV' de 350 nm de incelenen LAB'ların ışımaları .....	59
<b>Görsel 3.4.</b> $\beta$ -galaktosidaz enziminin varlığıyla ortamın sarı renge dönüşmesi .....	60
<b>Görsel 3.5.</b> Distile su ve hekzanla muamele edildikten sonra 3 faz oluşumu.....	62
<b>Görsel 3.6.</b> Model oluşan gruplarda yem tüketimi.....	70

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

LAB	: Laktik asit bakterisi
°C	: Santigrad derece
%	: Yüzde
µL	: Mikrolitre
GIT	: Gastrointestinal sistem
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü
IDF	: Uluslararası Diyabet Federasyonu
DM	: Diyabetes Mellitus
TURDEP-I	: Türkiye Diyabet Epidemiyoloji
L	: Litre
M	: Molar
vd	: Ve diğerleri
MRS	: de Man, Rogosa, Sharpe

## 1. GİRİŞ

Diyabet (Diabetes Mellitus), insülin etkisi ve insülin sekresyonu yada her ikisinden kaynaklanan hiperglisemi ile karakterize edilen metabolik bir hastalıktır. Kronik hiperglisemi, organlarda uzun süreli hasara, işlev bozukluğuna ve özellikle gözler, böbrekler, sinirler, kalp ve kan damarlar rahatsızlıkları ile ilişkilidir (American Diabetes Association, 2014). Diyabetin 21. yüzyılın en hızlı büyüyen küresel sağlık sorunlarından biridir (Görsel 1). 2019 yılında 463 milyon insanın diyabet hastası olduğu ve bu sayının 2030'da 578 milyona, 2045'te 700 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Diyabetli kişilerin üçte ikisi kentsel alanlarda yaşamakta, dörtte üçü çalışma çağındadır. 2019'da 20-79 yaş arası dört milyondan fazla insanın diyabetle ilgili nedenlerden hayatını kaybettiği tahmin edilmektedir. Diyabete yakalanan çocuk ve ergenlerin (yani 19 yaşına kadar) sayısı her yıl artmaktadır ve 2019'da bir milyondan fazla çocuk ve ergenin tip 1 diyabetli olduğu tespit edilmiştir. 65 yaşın üzerindeki tahmini 136 milyon insanda diyabet olduğu bildirilmektedir (International Diabetes Federation, 2019).



**Görsel 1. 1.** 2019, 2030 ve 2045'te (20-79 yaş) dünya çapında diyabetli kişi sayısı (International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 9th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2019. <https://diabetesatlas.org/en/>)

Sıcak kanlı hayvanların ve insanların bağırsak sistemleri 500' den fazla farklı mikroorganizma türünün bir arada yaşadığı kompleks ekosistemlerdir. Bu ekosistemlerde bulunan mikroorganizmalar “doğal mikrobiyota” olarak tanımlanmaktadır. Temelde “zararlı” ve “yararlı” mikroorganizmalar olarak iki gruba ayrılmaktadır. Sağlıklı konakçının normal florasında bu gruplar dinamik bir denge halindedir. İntestinal ekosistemin fizyolojik dengesi hastalık, yaşlılık, stres, antibiyotik kullanımı, diyet alışkanlıklarının değiştirilmesi ve iklim koşullarından meydana gelen değişimler nedeniyle zararlı mikroorganizmaların gelişim ortamı sağlanmaktadır. Bu durumda bozulan dengenin yararlı ve etkili mikroorganizmalarla desteklenmelidir (Çakır, 2003)

Son yıllarda insanların doğal katkı maddelerine yönelmeleri probiyotik içeren gıdaların tüketilmesi, üretilmesi ve bu gıdalardan daha fazla nasıl faydalanılabilir sorusu araştırma konusu olmaktadır. Zararlı ve kimyasal madde kullanımı yerine bu probiyotiklerin kullanılması daha sağlıklı, ekonomik olacağı düşünülmektedir. Gelişen teknolojiyle birlikte insanlar, içerisinde sağlığa zararlı katkı maddeleri bulunduran gıdalar yerine, probiyotik içeren daha doğal ve sağlıklı beslenmeyi tercih etmeye başlamışlardır (Genç, 2016).

İntestinal sistemde bulunan faydalı mikroorganizmalar gıdaların sindirimine yardımcı olmaktadır. Bu nedenle *Lactobacillus* suşları, bağırsak mukus tabakasına yapışması, kolonize olması ve antimikrobiyal maddeler üretme yetenekleri ile karakterize edilmektedir (Pithva vd., 2014). Probiyotik suşların bu özellikleri gastrointestinal sistem (GIT) patojenleri ve gıdaların bozulmasında rol oynayan patojenler ile rekabet etmesine izin vermektedir. Bunların antimikrobiyal etkileri, antimikrobiyal bileşiklerin, yani bakteriyosinler, organik asitler, hidrojen peroksit vb. bileşiklerin üretiminden kaynaklanmaktadır (Bove vd., 2013). Bu sebeple, bağırsak florasını düzenleyerek konakçının sağlığı üzerine yararlı etkileri olan mikroorganizmalara “probiyotik” denilmektedir. Bu probiyotiklerin en önemlileri *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* cinsine ait türlerdir (Salminen 1999; Salminen vd. 1998; Klaenhammer 2000).

*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus* cinsine ait laktik asit bakterileri (LAB) probiyotik olarak karakterize edilmektedir. “Genellikle Güvenli Olarak Kabul Edilir” özelliğine sahip LAB, gıda ve süt endüstrisinde uzun süredir güvenli kullanımı, insan sağlığı üzerinde çok çeşitli faydalı etkiler gösteren probiyotik özellikleri nedeniyle

araştırmacıların ilgi odağı olmaktadır. Probiyotik organizmaların in vitro ve in vivo olarak istenilen fonksiyonel özelliklere sahip olması beklenmektedir. En yaygın olarak kullanılan in vitro testler, diğer sindirim enzimleri dışında mide asiditesinde ve bağırsak safra tuzlarında dirençli olmaları ve hayatta kalabilmeleridir. İnsanın sindirim sisteminde her gün yaklaşık 2.5 L mide öz suyu (Kimoto vd., 2000) ve 1 L safra suyu (Begley vd., 2005) salgılanmaktadır. Bu sebeple, probiyotik bir suşun mideöz suyunda, sindirim enzimlerine karşı ve ince bağırsağın safra tuzlarında düşük pH'da hayatta kalması gerekmektedir (Aarti vd., 2019).

Probiyotiklerin B-grubu vitaminlerini tiamin (B1), riboflavin (B2), niasin (B3), pantotenik asid (B5), piridoksin (B6), biotin, folik asid (B9, B10, B11) ve kobalamin (B12) ve antimikrobiyal metabolitlerini (nisin, organik asitler) oksidatif stres azaltma, kolesterol düşürücü etki, anti-diyabetik etki ve antiobezite etkisi gibi konakçı sağlığı üzerindeki önemli terapötik ve faydalı etkileri birçok çalışmada bildirilmektedir (Gaspar vd., 2018; Yadav vd., 2018; Kim vd., 2018 ).

Bu çalışmanın amacı, probiyotikler antidiyabetik etki ve antioksidan özellikler nedeniyle diyabet için alternatif terapötik ajan olarak düşünölmektedir. Bununla birlikte probiyotiklerin antidiyabetik etkilerinin mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Bu nedenle farklı izolatların antidiyabetik etkilerinin ortaya koyulması ve sonrasında yapılacak çalışmalarda bu etkilerin mekanizmalarının detaylı olarak incelenmesi önem taşımaktadır. Bu hususlar göz önüne alınarak daha önce yapılan çeşitli araştırmalarda izole edilen LAB' nin ön tarama yöntemlerinde yüksek etkiye sahip olan bir izolatın anti-diyabetik etkisinin olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

## **1.1. Probiyotik**

### **1.1.1. Probiyotiklerin Tanımı ve Tarihçesi**

Probiyotik kelimesi, Yunanca kökenli olup 'pro' ve 'biota' dan türetilmiştir. 'Yaşam için' ve 'yaşamsal' anlamlarına gelmektedir (Gültekin, 2004; Sinkiewicz, 2010; Soccol vd., 2010). Probiyotik kavram olarak ilk kez 19. yüzyılın sonlarına doğru ortaya çıkmıştır.

Bu kavramı 1908 yıllarında ilk kez Nobel ödüllü Rus bilim insanı Elie Metchnikoff tanıtmıştır. Yaşlanma üzerine çalışmalar yapan Metchnikoff, Bulgar ve Kafkas köylülerinin uzun yaşadıklarını fark etmiş ve bu durumunda burada yaşayan

köylülerin çok fazla miktarda fermente süt ürünlerini tüketmelerine bağlamıştır. Metchnikoff, fermente süt tüketimi ile bağırsak florasının olumsuz etkilerinin ortadan kaldırılabileceğinin doğru orantılı olduğunu saptamıştır. Böylece insanların daha uzun süre hayatlarının devam edeceğini bildirmiştir (Özden, 2005; Özen, 2011). Bir diğer çalışmada ise probiyotik terimi ilk olarak, 1965 yılında Lily ve Stillwell tarafından bir organizma tarafından salgılanan ve başka bir organizmanın büyümesini teşvik eden maddeleri tanımlamak için kullanılmıştır (Sarao ve Arora 2017).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) ve Uluslararası Probiyotik ve Prebiyotik Bilimsel Derneği 2014 yılında Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO) göre, "Probiyotikler, yeterli miktarda vücuda alındığında konakçısına yarar sağlayan canlı mikroorganizmalardır" şeklinde tanımlanmaktadır (FAO/WHO, 2006). Probiyotik bakteri, Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinin Genel Etiketleme ve Beslenme Yönünden Etiketleme Kuralları Tebliği'ne göre; bu mikroorganizmalar besinlerle ve belirli miktarda alındığında bağırsak mikrobiyotasını dengeleyip konakçının sağlığını olumlu yönde etkileyen canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (Genç, 2016). Son olarak en güncel tanım, 2002 yılında Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) işbirliğiyle probiyotik tanımı; "gıda olarak yeterli miktarda alındığında konakçının sağlığına yararlı olan canlı mikroorganizmalar" olarak tanımlanmıştır (Mizock, 2015).

Probiyotik mikroorganizmalar, vücuda alındığında sindirim sisteminde, ağızda, üst solunum yollarında, ürogenital sistemde canlılıklarını koruyarak bağırsaklara ulaşarak, bağırsaklarda gelişim sağlayarak, bağırsak çeperlerinde biyolojik etki gösteren mikroorganizma kültürleridir (Özer ve Akın 2000; Kanmani vd. 2013; Turchi vd., 2013). Sağlıklı olan bir insanın, bağırsak mikrobiyotasında  $10^{14}$  adet, 3 ile 4 milyon gen kodlayan mikroorganizma yaşadığı düşünülmektedir. Mikrobiyal genom, bağırsak mikrobiyotasının insan genomunda kodlanmamış, konakçıya faydalı olan çeşitli metabolik aktiviteleri gerçekleştirebilmesini sağlamaktadır (Mizock, 2015).

### **1.1.2. Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar**

Probiyotik olarak kullanılan farklı bakteri türleri vardır fakat büyük bir kısmı LAB olarak tanımlanmaktadır. İnsanın GI mikroflorasının önemli bir parçası olup ve zararlı özellik taşımayan geniş bir bakteri grubuna dahildir (Karaca, 2015; Gionchetti vd., 2000). Farklı cinslere ait birçok mikroorganizma probiyotik olarak kullanılıp ve en

yaygın olarak kullanılanlar ise laktik asit bakterileri, enterokoklar, laktobasiller ve bifidobakterilerdir. Özellikle bu probiyotiklerin içinden laktobasiller probiyotik olarak kullanılan bakterilerin başında gelmektedir. Probiyotik olarak kullanılan laktik asit bakterilerinin sağlığa faydalı etkileri sulara özgüdür. Bu etkilerin ortaya çıkışı farklı mekanizmalarla gerçekleşmektedir (Tok ve Aslım, 2007).

**Tablo 1.1.** Probiyotik mikroorganizmalar (Holzapfel vd., 2001)

<i>Lactobacillus</i> türleri	<i>L. bulgaricus</i> , <i>L. cellebiosus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. amilovorvus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. gallinarum</i>
<i>Bifidobacterium</i> türleri	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. thermophilum</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. lactis</i>
<i>Bacillus</i> türleri	<i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. lentus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. coagulans</i>
<i>Pediococcus</i> türleri	<i>Pediococcus cerevisiae</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>P. pentosaceu</i>
<i>Streptococcus</i> türleri	<i>S. cremoris</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. lactis</i> , <i>S. diacetilactis</i>
<i>Bacteriodes</i> türleri	<i>B. capillus</i> , <i>B. suis</i> , <i>B. ruminicola</i> , <i>B. amylophilus</i>
<i>Propionibacterium</i> türleri	<i>Propionibacterium</i> türleri <i>P. shermanii</i> ssp. <i>freudenreichii</i>
<i>Leuconostoc</i> türleri	<i>Leuconostoc</i> türleri <i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Küfler	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>
Mayalar	<i>S. cerevisiae</i> , <i>C. Torulopsis</i> , <i>Saccharomyces boulardi</i>

### 1.1.3. Laktik Asit Bakterileri

LAB'lar; kok, ovoid, çomak şekillerinde olabilen, gelişme sıcaklıkları termofil ve mezofil özelliği göstermektedirler. Yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişme, 10-45 °C sıcaklık arasında, asit veya alkali ortamları tolere etme yeteneklerine sahiptirler (Şahin,

1995; Etöz, 2006). Ayrıca LAB'ların çoğu 4-4,5 pH' da gelişme göstermektedirler. Bazıları 3,2 ve 9,6 gibi pH' larda geliştikleri görülmektedir (Holt vd., 2000).

LAB' lar anaerobik koşullar altında gelişim göstermektedirler. Pek çok anaerobik bakterinin tersine oksijene karşı duyarlı değildirler. Oksijen varlığında da gelişim gösterebilmektedirler. Laktik asit bakterileri gelişimleri için oksijene pek fazla ihtiyaç duymayıp, çok az oksijen bulunan (mikroaerofil) veya hiç oksijen bulunmayan (anaerob) ortamlarda gelişim göstermektedirler. Bundan dolayı aerotolerant anaerob mikroorganizmalar olarak da isimlendirilirler (Muck, 2010)

LAB' nin optimum 30 °C ve 4.0-4.5 pH değerlerinde gelişim göstermektedirler. Laktik asit bakterilerinin, gelişebilmesi ve çoğalabilmeleri için ihtiyaç duydukları pH ve asidite düzeyleri arasında büyük farklar bulunmaktadır. En düşük pH değeri 3.0-3.6 aralığındadır. Fakat bu pH değerlerinin çok altında bile kuvvetli asit oluşturma özelliği gösteren türlerinin varlığının yanı sıra, pH 4.5 üzerinde faaliyet gösteremeyen *Lactobacillus brevis* gibi türlerinin mevcut olduğu bilinmektedir. Laktik asit bakterileri genel olarak ortam sıcaklığının 20-40 °C sıcaklık aralığında en yüksek aktivite göstermektedirler (Aydın, 2019).

LAB antimikrobiyel bileşikler üretebilme yeteneklerine sahip olmalarından dolayı son 15 yıldır gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadır. Bu antimikrobiyal bileşikler; organik asit, diasetil, aseton, hidrojen peroksit, reuterin, antifungal peptitler ve bakteriyosinlerdir. LAB' nin bir çok üyesinin bakteriyosin ürettiği bilinmektedir. *Lactobacillus acidophilus* tarafından üretilen acidophilin ve lactocidin, *Lactobacillus plantarum* tarafından üretilen lactolin ve *Lactococcus lactis* tarafından üretilen nisin maddeler antibakteriyel etki göstermektedir. LAB' nin ürettikleri bakteriyosinler bakterilerin türüne bağlı olarak gıda kökenli patojen bakterileri inhibe edebilmektedirler. Bunun yanında bakteriyosinlerin bazı gram negatif bakteriler üzerinde de etkili olduğu bildirilmiştir (Messi, 2001).

LAB, hem ev hem de sanayide fermente gıdaların üretimi için yaygın olarak kullanılan önemli bir fermantatif bakteri grubunu içermektedir. Aynı zamanda normal bağırsak mikroflorasının bir parçasıdır. Çok sayıda çalışma, LAB' nin probiyotik organizmalar olarak geniş bir uygulamaya sahip olduğunu, insanlara ve diğer hayvanlara yararlı sağlık etkileri olduğunu göstermektedir (Saxelin vd., 2005).

Ayrıca, sağlığa faydalı enzimler, LAB suşlarının probiyotik fonksiyonlarından sorumlu safra tuzu hidrolaz (BSH),  $\beta$ -galaktosidaz üretirler ve BSH aktivitesine sahip laktobasillerin serum kolesterol seviyesini düşürdüğü bildirilmektedir (Goldin, 2011).

#### **1.1.4. Probiyotiklerde Aranılan Özellikler**

Mikroorganizmanın, probiyotik olarak insanlar tarafından güvenilir bir şekilde kullanılabilmesi için deneysel ve klinik çalışmalarla o mikroorganizmanın probiyotik özelliklerinin belirlenmesi gerekmektedir. Probiyotik özellikler türlere özgüdür (Gülmez ve Güven, 2002).

Probiyotik bakterilerde aranılan şunlardır (Tuğba, 2019) ;

- Bağırsak epiteline tutunabilmeli,
- Sindirim sistemi mikroflorasının dengede tutulmasını sağlamalı,
- Patojenlerin gelişimini engellemeli ve tüketilen gıdaların yararlanma derecesini artırmalıdır,
- Antibakteriyel direnci, patojen mikroorganizmalara nakletmemelidirler,
- Gıdalara eklendiğinde kalitesini düşürmemelidirler,
- Patojenlere inhibitör etki yapmalıdırlar,
- Metabolik aktiviteyi düzenlemelidirler,
- Patojenlere karşı immün sistemi güçlendirebilmelidirler,
- Konakçının, gıdalardan daha fazla yararlanmasını sağlamalıdır,
- Patojen ve toksijenik olmamalıdır,
- Mikroorganizmanın adaptasyonunu kolaylaştırmak için insan orijinli suşlar seçilmelidir,
- Depolama sırasında canlılığını koruyabilmeli ve antimikrobiyal maddeler üretebilmelidir (Yılsay ve Kurdal 2000).

#### **1.1.5. Probiyotik Bakterilerin Sağlıktaki Rolü ve Etki Mekanizması**

Probiyotikler; gıdaların besin değerini artırır, bağırsak sağlığını iyileştirmek, antimikrobiyal maddeler üretmek, patojenlerin epitel ve mukozal yapışmasının engellemek, sınırlı besinler için rekabet sağlamak, patojenlerin epitelyal invazyonun inhibe edilmek, bağışıklık sisteminin modülasyonunu, bağırsak mikrobiyotası, bağırsak aktivitelerini düzenlemek gibi birçok mekanizmayla enfeksiyonu önlemektedir (Dunne vd., 1999; Salminen vd.,1998). Probiyotiklerin etki mekanizmaları konusunda oluşan

bilgiler doğrultusunda, çoklu etki mekanizmalarının olabileceği ve her bir suşa özel işlevsel mekanizmalar öne sürülebilmektedir (Gueimonde ve Salminen, 2006).

**Tablo 1.2.** Probiyotik Etki Mekanizmaları (Bozkurt ve Aslım 2004; Mercenier vd., 2002)

Sağlığa faydalı oldukları alanlar	Öne sürülen mekanizmalar
Laktoz intoleransı	Bakteriyal galaktosidazın, laktoz üzerine etki etmesi.
Barsak mikrobiyotası üzerine olumlu etkisi	Toksik metabolit üretiminin azaltılması yoluyla, aşırı gelişmiş olan floranın aktivitesinin etkilenmesi ve antibakteriyal özellikler göstermektedir.
İmmün sisteminin güçlendirilmesi	Beyaz kan hücrelerinin fagositik aktivitelerinin, IgA üretiminin artırılması ve intra-epitel lenfositlerin çoğaltılması
<i>Helicobacter pylori</i> ' nin sebep olduğu enfeksiyonlar	Laktik asit üretimi ve <i>H.pylori</i> 'nin üreaz aktivitesinin azaltılması
Kan lipitlerinin düşürülmesi ve kalp hastalığının riskinin azaltılması	Kolesterol maddelerinin asimilasyonu ve safra tuzu hidrolazın dekonjugasyonun artması ile bu safra tuzlarının atılımının artırılması
İntestinal sistemdeki enfeksiyonların engellenmesi	Sistemik veya salgısal immün cevap stimülasyonu, barsak koşullarının, patojenlerin gelişmesine izin vermeyecek şekilde değiştirilmesi (pH, kısa zincirli yağ asitleri, bakteriyosinler) Agregasyon, koagregasyon yetenekleri ve intestinal mukozaya yapışmak suretiyle patojenlerin yapışmasının engellenmesi
Ürogenital enfeksiyonlar	Vajinal, üriner kanal hücrelerine yapışma ve çok iyi kolonize olabilmeye bunu yanında inhibitör maddelerin üretimi (hidrojen ve oksijen gibi)
İltihap veya alerjik reaksiyonların azaltılması	Bağışıklık sisteminin dengesinin, yeniden düzenlenmesi ve sitokin sentezinin düzenlenmesi

**Tablo 1.2.** (Devam) *Probiyotik Etki Mekanizmaları (Bozkurt ve Aslım 2004; Mercenier vd., 2002)*

Sağlığa faydalı oldukları alanlar	Öne sürülen mekanizmalar
Kolon kanseri riskinin önlenmesi	<p>İmmün sistemi güçlendirmesi ve mutajenik materyalleri bağlama, kısa zincirli yağ asitlerinin oluşturulması ile kanser hücrelerinin oluşumun engellenmesi</p> <p>Kanser yapıcıların aktivitelerini inhibe etme ve intestinal sistem mikroorganizmalarının ürettiği kanser yapıcı materyalleri üreten enzimlerin engellenmesi</p> <p>Laktasif etki ile toksik metabolitlerinin kolonda kalmasının azalması ve ikincil safra tuzu derişimlerini etkileme (Laparra ve Sanz 2010).</p>

**Laktoz İntoloransı:** Laktozun bağırsaklarda sindirilebilmesi için ince bağırsakta  $\beta$ -galaktosidaz enziminin (laktaz) bulunması gerekmektedir. Laktaz enzimi salgılanmaması veya yetersiz salgılanması gibi durumlarda laktoz intoleransı ortaya çıkmaktadır. Probiyotiklerin bakteriyel laktaz enzimi, laktozun sindirimine yardımcı olarak laktoz intoleransı azaltıcı etkisi ortaya çıkmaktadır. Yapılan çalışmalarda, *Lactobacillus acidophilus*'lu süt tüketmenin laktozun sindirimini kolaylaştırdığı araştırmalar sonucu ortaya çıkmıştır (Swagerty vd., 2002). Bunun yanında yoğurta bulunan probiyotik suşlar laktaz enzimleri laktozu kalın bağırsağa ulaşmadan sindirmektedir. Ortaya çıkacak semptomları önlemektedir (Ceyhan ve Alıç, 2012).

**Serum kolesterol seviyesinin düşürülmesi;** Probiyotik içeren süt ürünlerinin tüketilmesi sonucunda serum kolesterol seviyesinde düşme tespit edilmiştir (Pan vd., 2011; Sirilun vd., 2010). Probiyotiklerin, kan serum kolesterol seviyesini düşürmesi bazı klinik çalışmalarla kanıtlanmıştır. Dışarıdan alınan veya vücut tarafından sentezlenen kolesterol safra asitlerine dönüşmektedir. Bazı probiyotik türler, örneğin; *L. acidophilus*, safra asitlerini konjuge edebilme yeteneğine sahiptirler. Bu bakteriler tarafından konjuge edilen safra asitleri lipitlere göre daha kolay emilmektedir. Bunun sonucunda serum kolesterol seviyesinde bir düşme meydana gelmektedir. Yapılan bir klinik araştırmada hiperlipidemik hastalara 3 ay süreyle *L. sporogenes* verildiğinde

serum kolesterol seviyesinin % 32 oranında azaldığı gözlemlenmiştir (Mohan vd., 1990; Isolauri vd., 2001)

## **1.2. Diyabet**

Diyabet, pankreasın beta hücrelerinden üretilen insülin hormonunun üretilmemesinden ya da insülinin hücreler tarafından etkili bir şekilde kullanılmamasından kaynaklanır. Vücudun yağ, protein ve karbonhidrat metabolizmasını etkileyen ve hiperglisemi ile seyreden kronik bir hastalıktır (Ural, 2018). Diyabet 4 ana grup şeklinde sınıflanmıştır (Inzucchi vd., 2010)

- Tip 1 diyabet
- Tip 2 diyabet
- Diğer spesifik tipler
- Gestasyonel

### **1.2.1. Diyabetin Epidemiyolojisi**

Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) 2014 yılında 20-79 yaş aralığındaki halkın %8,2'sinin (387 milyon kişi) diyabet ile yaşadığını bildirmiştir. Bu rakamlar 2013 yılında, 382 milyon kişi iken 2035 yılında 592 milyon kişi olacağı öngörülmektedir (Guariguata, 2014). Bu diyabetteki yükselişlerin özellikle gelişmekte olan ülkelerde 45-64 yaş grubunda daha yüksek oranda gerçekleşeceği vurgulanmaktadır (Baba, 2016). Türkiye'de 1998' de yapılmış olan Türkiye Diyabet Epidemiyoloji (TURDEP-I) çalışması ile 2010 yılında yapılmış olan Türkiye Diyabet Epidemiyoloji (TURDEP-II) çalışması kıyaslandığında 12 yılda diyabet sıklığı %90 artmıştır. Bu çalışmalarda, diyabetin çok ciddi şekilde önemszenmesi gereken bir sağlık sorunu olduğunu ortaya koymuştur (Demirbaş, 2019).

### **1.2.2. Tip 1 Diyabet**

Tip 1 diyabet, dünya çapında yaklaşık 20 milyon kişiyi etkilemektedir (American Diabetes Association, 2001). Tip 1 diyabet, tüm yaş gruplarında rastlansada bu kişilerin çoğu 4-5 yaşlarında veya gençlerde ve erken erişkinlik döneminde teşhis edilmektedir (Blood vd., 1975). Avrupanın genelinde 15 yaşın altındaki çocuklarda Tip 1 diyabete yakalanma sıklığı ortalama yıllık artış % 3,4' tür (EURODIAB ACE study Group, 2000). En yüksek artışın 5 yaşın altındaki çocuklarda olduğu görülmektedir (Karvonen vd., 1999).

Tip 1 diyabetin oluşmasına yol açan insülin eksikliğinin pankreatik beta hücrelerine karşı olan immün toleransının olmaması nedeniyle beta hücre hasarına yol açmaktadır (Waldron-Lynch ve Herold, 2009). Tip 1 Diyabetin ortaya çıkışında otoimmün sistem, genetik ve çevresel faktörler etkilidir (Alphan, 2013). Tip 1 diyabetin tipik semptomları Görsel 1.2'de gösterilmektedir. Bununla birlikte, aşırı susama, sık idrara çıkma ve kilo kaybı görülmektedir (International Diabetes Federation, 2019).



**Görsel 1.2.** Tip 1 diyabetin semptomları (International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas, 9th edn.* Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2019. <https://diabetesatlas.org/en/>)

Pankreasta bulunan beta hücrelerinin yıkımı sonucunda insülin sekresyonunda eksikliğe yol açmaktadır. İnsülin sekresyonunun azalmasıyla birlikte pankreatik beta hücrelerinin fonksiyonu bozulur. Bunun sonucunda aşırı glukagon salınımı oluşmaktadır. Normal koşullarda hiperglisemi durumunda pankreastan glukagon salınımının azaltılması gerekmektedir. Ancak Tip 1 diyabetli hastalarda glukagon hiperglisemi varlığında baskılanamaz. Karşılaşılan bu metabolik bozukluğa örnek insülin yokluğuna bağlı hızlıca gelişen diyabetik ketoasidozdur. İnsülin yokluğunun kontrolsüz olmasının sonucunda lipoliz ve plazmada, kas hücresi gibi periferel dokularda, glikoz metabolizmasını baskılayan serbest yağ asitlerinde artış meydana gelmektedir. Glikoz kullanımındaki bozukluk ve insülin eksikliği karaciğerde bulunan glikokinaz enzimi gibi hedef hücrelerde insüline yanıt veren pek çok genin ekspresyonunu azaltıp bozmaktadır. Tip 1 diyabetli hastalarda insülin yetersizliği

sonucunda glikoz, yağ ve protein metabolizmalarında bozulmalar meydana gelmektedir (Ozougwu, 2013).

### 1.2.3. Probiyotiklerin Diyabet Üzerine Etkisi

Probiyotik bakteriler ve diyabet üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Probiyotik özellik gösteren bakterilerin antidiyabetik etkileri olduğu düşünülmektedir. *Lactobacillus* ve *Bifidobacteria'* nin antidiyabetik etkisi birçok çalışmada araştırılmıştır. Çalışmalarda *Lactobacillus* suşlarının HbA1c ve açlık ile tokluk kan glukoz seviyelerini azalttığı bunun sonucunda da antidiyabetik etki gösterdiği saptanmıştır (Yun vd., 2009; Andreasen vd., 2010; Moroti vd., 2012; Mazloom vd., 2013). Fare modeli çalışmalarında probiyotikler kullanılmıştır ve bu probiyotiklerin glukogenogenezi inhibe ettiği, glukoz seviyelerini düşürdüğü gözlemlenmiştir (Everard vd., 2013; Isik vd., 2016).

Fare modelinde yapılan çalışmalarda *Lactobacillus casei* kullanılmıştır. İnsüline bağımlı olmayan diyabet için antidiyabetik etkisi olduğu saptanmıştır. 4 haftalık model oluşturulan farelere oral uygulama ile % 0.5 *Lb. casei* verilmiştir. Plazma glukozu, 8-10 haftalık olduklarında kontrol grubu farelerle karşılaştırıldığında önemli derecede düşüş göstermiştir (Matsuzaki vd., 1997a,b,c). Streptozotosin (STZ) ile model oluşturulmuş farelerde, *Lactobacillus GG'* nin oral uygulamasıyla kan glikozillenmiş hemoglobin seviyesini önemli derecede düşürmüştür. Bunun yanında glukoz tolerans testini geliştirmiştir ve *Lactobacillus GG* uygulanmış grupta insülin salgılayma aktivitesini devam ettirmiştir (Tabuchi vd., 2003).

Probiyotik olan *Streptococcus thermophilus*, *L. caseii*, *L. acidophilus* ve *Bifidobacterium Lactis* bakteriler ile yapılan çalışmada kefir içerisine bu bakteriler ilave edilmiştir. Bu kefirin tüketilmesiyle serum glukoz ve HbA1c seviyelerinde düşüş meydana geldiği gözlemlenmiştir (Ostadrhimi vd., 2015). Bir diğer çalışmada *L. acidophilus* La5 ve *B. lactis* Bb12 içeren keçi sütünün tüketilmesiyle birlikte kan glukoz regülasyonu, inflamasyon ve kan lipid seviyesinin üzerine etkili olduğu saptanmıştır (Tonnucci vd., 2017).

### 1.2.4. Kan Glukoz Kontrol Hedefleri: Güncel terapötik stratejiler

Diyabetik koşullarda kan glukoz seviyesini kontrol etmke için çeşitli terapötik stratejiler kullanılmaktadır. Tip 2 diyabet için, piyasada çeşitli oral ilaçlar bulunmaktadır. Kan şekerini ayarlamak için vücut fizyolojisinin çeşitli basamaklarını

bloke ederek ayarlamaya çalışmaktadır.  $\alpha$ -glukosidaz aktivitesini engelleyerek glukozun bağırsaktan emilimini azaltır, periferel dokuların insülin duyarlılığını artırır, pankreatik  $\beta$ -hücrelerini uyarır ve insülin üretimini artırır ve hepatil glukoz üretimini inhibe etmektedir. Çeşitli oral hipoglisemik farmakolojik ajanlar, sülfonilüreler, tiazolidinediyonlar (TZD), biguanidler ve  $\alpha$ -glukosidaz inhibitörleri farklı hedeflerde çalışarak hiperglisemi tedavi etmek için kullanılmaktadır.

Sülfonilüreler (insülin salgılatıcılar) kimyasalları pankreasın daha fazla insülin salgılaması için uyarır. Sülfonilüreler, Tolbutamide (Orinase®), Tolazamide (Tolinase®), Glipizide (Glucotrol®, GlucotrolXL®)  $\beta$ -hücrelerinin plazma membranında bulunan reseptörlere etki etmektedir.  $\alpha$ -glukosidaz inhibitörleri karbonhidatların sindirilmesini yavaşlatır. Glukoz emilimini geciktirir ve yemek yedikten sonra kan şekerinin yükselmesini azaltmaktadır. Acarbose (Precose®) ve Miglitol (Glyset®) (Tyrberg ve Levine, 2001).

Diğer popüler oral antidiyabetik bileşikler ise tiazolidinediyonlardır. Vücut hücrelerini insüline karşı daha duyarlı hale getirerek insülin direncinin üstesinden gelmek için kullanılmaktadır. Örneğin, Pioglitazone (Actos®) ve Posiglitazone (Avandia®).

### **1.2.5. Diyabet İçin Alternatif Tedaviler**

İnsanlar tarafından kullanılan alternatif tedavileri inceleyen çalışmalar alternatif tedavileri desteklemektedir. Ekonomik sıkıntılar, yaşam kalitesindeki potansiyel tehdit, diyabetin kronik doğasından dolayı birçok insan bununla üstesinden gelmek için alternatif tedavilere yönelmektedir. Ryan vd. (1999) Kanada'da %25 diyabetli hastanın alternatif tedavi kullandığını bulmuştur. Kullanılan esas tedaviler, bitkiler, masaj, beslenme terapileri ve meditasyonlardır.

## 2. MATERYAL ve YÖNTEM

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Bakteriler

Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi mikrobiyoloji laboratuvarında önceden insan kaynaklı, oral ve peynir'den izole edilmiş laktik asit bakterilerinden 62 tane kültür seçilmiştir.

#### 2.1.2. Patojen Bakteriler

*Klebsiella Pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas*, *Candida albicans*, *Bacillus cereus*.

#### 2.1.3. Besiyerleri

##### 2.1.3.1. MRS (*de Man, Rogosa, Sharpe*) agar

MRS Agar (Merck, 110660) 68,2 g

Distile su 1000 ml

Besiyeri distile suda iyice çözdürüldükten sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

##### 2.1.3.2. M17 agar

M17 Agar (Merck, 115108) 55 g

Distile su 1000 ml

Besiyeri distile suda iyice çözdürüldükten sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

##### 2.1.3.3. BHI (*Brain Heart Infusion*) agar

BHI agar (Sigma-Aldrich, 70138) 52 g

Distile su 1000 ml

Besiyeri distile suda iyice çözdürüldükten sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

##### 2.1.3.4. Patates dektroz agar (PDA)

Patates Dektroz Agar (Merck, 110130) 39 g

Distile su 1000 ml

Besiyeri distile suda iyice çözdürüldükten sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

#### **2.1.3.6. *Mueller hinton agar***

Mueller Hinton Agar (Merck, 105437) 35 g

Distile su 1000 ml

Besiyeri distile suda iyice çözdürüldükten sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

#### **2.1.3.7. *MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) broth***

MRS Broth (Merck, 110661) 50 g

Distile su 1000 ml

Besiyeri distile suda iyice çözdürüldükten sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

#### **2.1.3.8. *BHI (Brain Heart Infusion) broth***

BHI Broth (Sigma-Aldrich, 70138) 52 g

Distile su 1000 ml

Besiyeri distile suda iyice çözdürüldükten sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

#### **2.1.3.9. *Skim Milk Besiyeri***

Skim milk 10 g

Distile su 100 ml

Besiyeri distile suda iyice çözdürüldükten sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

#### **2.1.3.10. *Elliker Agar***

Tryptone 20 g

Yeast extract 5 g

Dekstroz 5 g

Laktoz 5 g

Sucrose 5 g

Sodium chloride 4 g

Gelatin 2,50 g

Sodium acetate 1,50 g

Ascorbic acid 0,50 g

Distile su 1000 ml

Besiyeri distile suda iyice çözdürüldükten sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

#### **2.1.3.11. PCA (Plate Count Agar)**

PCA (Merck 1.05463) 22,5 gr

Distile su 1000 ml

Besiyeri distile suda iyice çözdürüldükten sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

#### **2.1.3.12. KF Streptococcus Agar**

KF Streptococcus Agar (Merck 1.10707) 76 gr

Distile su 1000 ml

Besiyeri distile suda iyice çözdürüldükten sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

#### **2.1.3.13. EMB (Eosin Methylen-blue Lactose Sucrose) Agar**

EMB Agar (Merck 1.01347) 36 gr

Distile su 1000 ml

Besiyeri distile suda iyice çözdürüldükten sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

### **2.1.4. Kimyasallar ve çözeltiler**

#### **2.1.4.1. %20'lik gliserol**

Gliserol 20 ml

Distile su 80 ml

Gliserol ve distile su karıştırıldıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

#### **2.1.4.2. %3'lük hidrojen peroksit**

%35'lik hidrojen peroksit 8,57 ml

Distile su 1,43 ml

#### 2.1.4.3. Lizozim solüsyonu

Lizozim (Sigma-Aldrich)	2 g
Distile su	100 ml

#### 2.1.4.4. Fosfat tamponu (PBS)

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g
Distile su	1000 ml

Tüm bileşenler distile su ile karıştırıldıktan sonra pH 7,2'ye ayarlanmıştır. 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

#### 2.1.4.5. Fizyolojik tuzlu su (FTS)

NaCl	85 g
Distile su	1000 ml

#### 2.1.4.6. Fosfat buffer (2M'lık)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	3,56 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	2,76 g
Distile su	100 ml

İki madde ayrı ayrı kaplara alınıp distile su ile sulandırılmıştır. 30,5 ml NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O çözeltisinden, 19,5 ml NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O çözeltisinden alınıp aynı kaptaki karıştırılmıştır. pH 7'ye ayarlanmıştır.

#### 2.1.4.7. 0,1 N NaOH çözeltisi

NaOH	3,4 g
Distile su	1000 ml

Distile su ile iyice karıştırılmıştır.

#### 2.1.4.7. Toluene-Aseton çözeltisi

Toluene	1 ml
Aseton	9 ml

Aynı kapa alınıp iyice karıştırılır.

#### 2.1.4.8. ONPG

ONPG 0,008 g

Distile su 1 ml

Distile su ile iyice karıştırılmıştır.

#### 2.1.4.9. Yıkama tamponu

40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,43 g

60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 3,20 g

Distile su 300 ml

Distile su ile iyice karıştırılıp pH 7' ye ayarlanmıştır. 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

#### 2.1.4.10. %33' lük Potasyum hidroksit (KOH) çözeltisi

KOH 33 g

Distile su 100 ml

Distile suda iyice karıştırılmıştır.

#### 2.1.4.11. İntestinal acetone powder from rat çözeltisi

Rat intestinal 0,01 g

Distile su 1 ml

Taze hazırlanmalıdır. Steril distile su içinde çözdürülmüştür.

#### 2.1.4.12. Akarboz çözeltisi

Akarboz 0,03 g

Distile su 1 ml

Taze hazırlanmalıdır. Steril distile su içinde çözdürülmüştür.

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Laktik asit bakterilerinin incelenmesi

Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında önceden izole edilen 62 laktik asit bakteri izolatu çalışmada kullanılmıştır.

Kültürler M17 broth ve MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) broth besiyerlerine ekilerek 24-48 saat %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edildikten sonra MRS ve M17 agara çizgi yöntemiyle ekilerek 24-48 saat %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübe edilmiştir.

İnkübasyondan sonra koloni morfolojisi incelenerek ve gram boyama yapılarak mikroskop altında kültürlerin saflığı belirlenmiştir. Saf olan kültürler %20'lik gliserolde -86 °C'de testlerde kullanılmak üzere stoklanmıştır.

#### **2.2.1.1. Gram boyama**

MRS ve M17 agarda %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 24 saat inkübe edilen kültürlerden preperat hazırlanmıştır. Lam üzerine alınıp kurutulup ateşte fikse edilmiştir. Preperat kristal viyole ile boyanıp 1 dakika bekletildikten sonra su ile yıkanmıştır. 1 dakika lügol muamele edilerek yine su ile yıkanmıştır. %95'lik etanol ile 20-25 saniye dekolorize edilmiştir. Ardından tekrar su ile yıkanmıştır. Preperat son olarak safranin ile 15 saniye boyanmıştır. Su ile yıkayıp kurutulduktan sonra ışık mikroskopunda bakteri morfolojisi incelenmiştir. Pembe renkte görünen koloniler Gram negatif, mor renkle görünen koloniler ise Gram pozitif olarak değerlendirilmiştir (Tamer vd., 1989).

#### **2.2.1.2. Katalaz testi**

MRS ve M17 agarda %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 24 saat inkübe edilen kültürlere birer damla %3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) damlatılmıştır. Damlatılan kültür üzerinde hava kabarcığı oluşumu katalaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. Hava kabarcığı oluşmadıysa da katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Akcelik vd., 2000).

#### **2.2.2. pH dirençliliği**

Farklı pH'larda bakterilerin gelişimine bakılmıştır. MRS ve M17 broth besiyerlerinin sırasıyla pH' ları 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 7, 8 olarak ayarlanmıştır. 18-24 saatlik bakteri kültürlerinden pH'sı ayarlanmış MRS ve M17 brotha inoküle edilip %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra MRS ve M17 katı besiyerine ekilerek bakterilerin canlılığı kontrol edilmiştir.

#### **2.2.3. Laktik asit bakterilerinin gastrointestinal şartlara direnci**

Laktik asit bakterilerinin gastrointestinal şartlara dirençli olup olmadıklarını belirlemek için safra tuzu direnç testi yapılmıştır.

##### **2.2.3.1. Safra tuzu (oxgall) direnci**

MRS ve M17 brothlar %0,3, %0,6, %1,25 ve %2,5 olacak şekilde safra tuzu eklenmiştir. 180 µl safra tuzu içeren besiyerlerine 18-24 saatlik bakteri kültürlerinden 20 µl bakteri kültürü inoküle edilerek %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 24-48 saat 37°C'de inkübe

edilmiştir. 0., 3. ve 24. saatte alınan örneklerin spektrofotometrede 630 nm’de optik yoğunluğu ölçülmüştür (Koll vd., 2008).

#### **2.2.4. Laktik asit bakterilerinin agregasyon aktiviteleri**

##### **2.2.4.1. Otoagregasyon**

MRS ve M17 brothta 18-24 saat %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edilen bakteri kültürleri 5.000 x g’de 15 dakika santrifüj edildikten sonra pelet iki defa PBS ile yıkanmıştır. PBS ile resüspanse edilen bakterilerin spektrofotometrede 600 nm başlangıçtaki optik yoğunluğu ölçülmüştür. Oda sıcaklığında 4 saatlik inkübasyon sonunda üst fazdan alınıp spektrofotometrede 600 nm de 4 saat sonraki optik yoğunluğu ölçülmüştür (Bosch vd., 2012). Otoagregasyon aktivitesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Otoagregasyon kapasitesi} = 1 - (\text{OD}_t / \text{OD}_0) \times 100$$

OD<sub>t</sub> : 4. saatteki optik yoğunluk

OD<sub>0</sub> : Başlangıçtaki optik yoğunluk

##### **2.2.4.2. Koagregasyon**

Bakterilerin koagregasyon aktivitesinin belirlenmesi için patojen bakteri olarak *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* seçilmiştir. Bakteri süspansiyonları otoagregasyonda belirtilen şekilde hazırlanmıştır. Laktik asit bakterisi ve patojen bakteri süspansiyonlarından eşit hacimde alınarak karıştırılmıştır. Tüm bakteriler kendi süspansiyonlarıyla birlikte 5 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda üst faz alınıp spektrofotometrede 600 nm’deki optik yoğunluğu ölçülmüştür (Taheur vd., 2016).

Koagregasyon aktivitesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

Koagregasyon kapasitesi =

$$[(\text{OD}_{\text{patojen}} + \text{OD}_{\text{LAB}}) - 2 \times (\text{OD}_{\text{mix}}) / (\text{OD}_{\text{patojen}} + \text{OD}_{\text{LAB}})] \times 100$$

OD<sub>patojen</sub> : Patojen bakterilerin optik yoğunluğu

OD<sub>LAB</sub> : LAB’lerinin optik yoğunluğu

OD<sub>mix</sub> : Patojen ve LAB’lerinin birlikte optik yoğunluğu

### 2.2.5. Laktik asit bakterilerinin hücre-yüzey hidrofobisitesi

Hücre-yüzey hidrofobisitesi kloroform ile test edilmiştir. MRS ve M17 brothta 18-24 saat %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edilen bakteri kültürler 10.000 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Peletler üç defa PBS ile yıkanmıştır. Pelet üzerine PBS eklendikten sonra spektrofotometrede 580 nm'de optik yoğunluğu ölçülmüştür (1. okuma). Ardından 1,5 ml hücre süspansiyonu ile eşit hacimde çözücü 2 dakika vortekslenmiştir. Elde edilen karışımın, iki fazının iyice ayrılabilmesi için 20 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Üst faz alınarak 580 nm'de 2. okuma yapılmıştır (Taheur vd., 2016).

Hücre-yüzey hidrofobisitesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Hidrofobisite} = [(OD_{1.okuma} - OD_{2.okuma}) / OD_{1.okuma}] \times 100$$

### 2.2.6. Laktik asit üretimi

Kültürlerin laktik asit üretim miktarları titrasyon yöntemi ile belirlenmiştir. MRS ve M17 brothta 18-24 saat %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edilen bakteri kültürleri 10 ml yağsız süt tozu (skim milk) besiyerine %1 oranında inokülasyon yapılarak %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 24-48 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürler erlene alınarak üzerine 90 ml distile su eklenip 100 ml'ye tamamlanmıştır. Elde edilen karışımın uzerine 5 damla fenol fitalein indikatörü damlatılmıştır. 0,1 N NaOH ile titrasyon işlemi başlatılıp çözeltiden damla damla eklenip karıştırılmıştır. Renk değişimi kalıcı olana kadar işleme devam edilmiştir. Renk değişiminin kalıcı olduğu gözlemlendiği zaman işlem durdurulmuştur. Kültürlerin ürettiği asit titre edilebilir yüzde asitlik olarak hesaplanmıştır (Genç, 2016).

$$\text{Asidite (\% laktik asit)} = \text{Harcanan } 0,1 \text{ N NaOH (ml)} \times 0,9 / \text{alınan örnek miktarı (ml)}$$

### 2.2.7. Laktik asit bakterilerinin süpernatantlarının antibakteriyal aktivitelerinin belirlenmesi

MRS ve M17 brothta 18-24 saat %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edilen bakteri kültürleri 4°C, 11.000 x g'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan süpernatant başka bir tüpe alınmıştır. Deneyde kullanılacak *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas*, *Candida albicans*, *Bacillus cereus* patojenler kullanılmıştır. Patojen mikroorganizmaların 24 saatlik kültürlerinden McFarland 1'e göre dilüsyon yapılmıştır. 100 µl Mueller Hinton Agar

besiyerine aktarılarak steril eküvyon ile yayılmıştır. Besiyeri yüzeyi iyice kuruduktan sonra mantar delici ile 0,8 cm çapında kuyucuklar açılmıştır. Bu kuyucukların her birine 100 µl filtrat eklenmiştir. %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 24-48 saat 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan inhibisyon zonlarının çapları ölçülmüştür (Arık, 2019).

#### **2.2.8. Lipolitik Aktivite**

Lipolitik aktivite tayininde steril Elliker agar içine rodamin B filtreden geçirilerek ilave edilmiştir. Bu steril karışımın içine ayrı ayrı steril zeytin yağı, ayçiçek yağı, tween 80 ve tween 20 konulmuştur. Bu katı besiyerleri petrilere dökülmüştür. MRS ve M17 brothta 18-24 saat %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edilen bakteri kültürleri bu besiyerine inoküle edilmiştir. %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 24-48 saat 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda UV’de 350 nm de örneklerle bakılmıştır. Eğer lipaz aktivitesi vasra turuncu bir ışığa, eğer yoksa pembe bir ışığa oluşmaktadır (Tanasupawat, 2015).

#### **2.2.9. β-galaktosidaz aktivitesi**

MRS ve M17 brothta 18-24 saat %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edilen bakteri kültürleri 9000 x g 10 dakika 4°C de santrifüj edilerek 5’er ml yıkama tamponuyla (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O ve 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) iki kez yıkanmıştır. Yıkanan peletlerin üzerine laktozlu MRS besiyerinden her tüpe 5 ml dağıtılmıştır. Kok olan izolatlar aerobik 25 °C etüvde, basil olan izolatlar ise 37 °C anaerobik etüve inkünasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda tekrardan santrifüj edilip yukarıda tarif edildiği gibi yıkanmışlardır. Her birine 2 ml tampon eklenerek 150 µl alıp 96’lı platelere koyup spektrofotometrede 560 nm de ilk okuma yapılmıştır (A<sub>1560</sub>). Tüplerden 1’er ml ependorflara alınmıştır. Üzerine 50 µl toluen/aseton (1/9) eklenmiştir. 7 dakika vortakslenmiştir. 100 µl başka ependorfa aktarılıp 900 µl fosfat tamponu eklenmiştir. 200 µl ONPG eklenip 37°C 15 dakika su banyosunda bekletilmiştir. Reaksiyonun durması için 500 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> her ependorfa eklenip 420 ve 560 nm de okunmuştur (Vinderola ve Reinheimer, 2003)

Yüzde β-galaktosidaz aktivitesi

$$1000 \times [(A_{420} - 1,75 \times A_{560}) / (15 \text{ dakika} \times 1 \text{ ml} \times A_{1560})]$$

### 2.2.10. Kolesterol Asimilasyonu

MRS ve M17 broth içine %0,3 oxgall ve 1 ml de 100 µg olacak şekilde kolesterol ilave edilip 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Tüplere 5'er ml besiyerinden ilave edilip %1 olacak şekilde MRS ve M17 brothta 18-24 saat %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edilen bakteri kültürlerinden eklenmiştir. %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 24-48 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 9000 x g de 15 dakika santrifüj edilmiştir. 1 ml süpernatandan alıp 1 ml %33'lük KOH eklendikten sonra 2 ml %95'lik etanol ilave edilmiştir. Vortekslenip 37° C su banyosunda 15 dakika bekletilmiştir. 2 ml distile su ve 3 ml hekzan ilave edilip vortekslenmiştir. Üstte oluşan hekzan sıvısından 1 ml alınıp 65°C su banyosunda hekzanın buharlaşması beklenmiştir. Üstüne 2 ml 0-fitalaldehit ilave edilip karıştırılmış ve 0,5 ml sülfürik asit eklenip 1 dakika vortekslenmiştir. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra spektrofotometrede 550 nm de ölçülmüştür. Aşağıdaki formül ile izolatların kolesterol asimilasyonu hesaplanmıştır (Shehata vd., 2016)

$$A = (B-C/B) \times 100$$

A=Kolesterolün giderimi(%)

B=Kontrol grubu ortamdaki kolesterol miktarı (µg)

C=Suşlardan elde edilen kültür ortamındaki kolesterol miktarı (µg)

### 2.2.11. Glukosidaz inhibisyonunun ölçümü

Glikosidaz inhibisyonu, karbonhidratlara inoküle edilen bakteri ekstratlarının fare bağırsak özütü ile inkübe edilerek glikoz oluşum hızı izlenip değerlendirilmiştir. Bakteri hücre lizati ve süpernatana çalışılmıştır. İzolatlar 3 kez aktifleştirildikten sonra 12000 g 15 dakikada santrifüj edilmiştir. Süpernatan deney için ayrılmıştır. Pelet iki kez PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi bittikten sonra peletin yaş ağırlığı 500 mg'a ayarlanmıştır. Üzerine 1 ml nuclease içermeyen su ilave edilmiştir. İyi karıştırıldıktan sonra 65 °C'de 30 dakika su banyosunda öldürülmüştür. Ardından buz içine alınan izolatlar sonikatörde 20 Khz 3 kez 30 saniyede parçalanmıştır. Parçalama işlemi bittikten sonra 12000 x g de 15 dakika santrifüj yapıp süpernatan deneyde kullanılmak üzere -70 °C' de saklanmıştır. Karbonhidrat olarak maltoz, sükroz, laktoz, nişasta kullanılmıştır. 300 µl karbonhidrat (30 mg/ml) içine süpernatam konulmuştur. 300 µl karbonhidrat (30 mg/ml) içine 150 µl PBS eklenmiştir (kontrol). 300 µl akarboz (30 mg/ml) kullanılmıştır (pozitif kontrol). 300 µl akarboz üzerine karbonhidrat eklenmiştir. Bu

reaksiyonlar 37°C 10 dakika su banyosunda inküde edilmiştir. İnkübasyon sonunda her bir tüpe 50 µl sıçan bağırsak aseton ekstratı (intestinal acetone powder from rat) eklenecek reaksiyon başlatılmıştır. Glikoz konsantrasyonları elabscience glucose (Glu) assay kit kullanılarak 0., 30., 60. ve 90. dakikalarda inkübasyon edilerek spektrofotometrede 505 nm de ölçülmüştür (Panwar vd., 2014).

### 2.2.12. Hayvan deneyleri

Çalışmada 24 tane 4 haftalık Sprague Dawley cinsi erkek sıçanlar kullanılmıştır. Her bir kafeste 3 hayvan olacak şekilde 8 kafes kurulmuştur. Bu kafeslerin 2 tanesi kontrol grubu diğer 6 tane kafeste deney grubu olarak planlanmıştır. Bu gruplar kontrol grubu, sadece streptozotosin (STZ) uygulanan grup, STZ uygulanmış ve probiyotik verilecek grup ve sadece probiyotik verilecek grup olarak çalışılmıştır. Deney süresi 8 hafta olarak planlanmıştır. Hayvanlar 24 °C sıcaklık, %55 nem ve 12 saatlik ışık-karanlık (8:00 a.m ve 8:00 pm) koşullarında normal besin ve su sağlanarak 5 gün süre ile laboratuvar koşullarına alıştırmıştır.



Görsel 2.1. Hayvanların kafes düzeni

#### 2.2.12.1. Glikoz tolerans testi

Hayvanlarda tip 1 diyabet modeli oluşturulmadan önce 16-18 saat aç bırakılan hayvanların glikoz tolerans testine bakılmıştır. 24 hayvana 1 g/kg olacak şekilde şeker yüklemesi yapılmıştır. 0., 30., 60., 120. dakikalarda 24 hayvanın kuyruk veninden bir

damla kan alıp IME-DC şeker ölçüm cihazı yardımıyla kan glukoz miktarı (mg/dl) ölçülmüştür (Tabuchi vd., 2003).

#### **2.2.12.2. Hayvanların şeker ölçümü ve su, yem takipleri**

Hayvanlarda tip 1 diyabet modeli oluşturulmadan önce 24 hayvanın kuyruk veninden bir damla kan alıp IME-DC şeker ölçüm cihazı yardımıyla şeker ölçümleri (mg/dl) kaydedilmiştir. Deney süresi boyunca 24 hayvanında haftada bir kez olacak şekilde şeker ölçümleri yapılmıştır ve su içmeleri, yem yemeleri takip edilmiştir.

#### **2.2.12.3. Hayvanlarda dışkıda bakteri sayımı**

Deney süresi boyunca her hafta bütün kafeslerden 1 gr dışkı toplanmıştır. 8 dilisyon yapıp MRS, M17, PCA, PDA, EMB, KF Streptococcus agar besiyerlerine damlatma yöntemiyle ekim yapılmıştır. MRS, M17, EMB, KF Streptococcus agara inoküle edilen örnekler %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 24-48 saat 37 °C'de, PCA besiyerine inoküle edilen örnekler 48 saat aerobik etüvde, PDA besiyerine ekilen örnekler ise 28 °C'de aerobik etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra besiyerlerinde oluşan koloniler sayılmıştır.

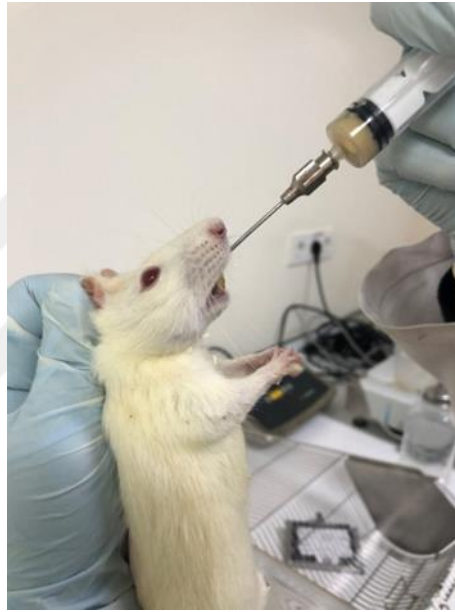
Deney süresi sonunda diseksiyonu yapılan hayvanlardan duodenum bölgesinden alınan doku örnekleri 1 ml tryptic soy brotha koyulup fizyolojik tuzlu su (FTS) kullanılarak 8 dilisyon yapılmıştır. MRS, M17, PCA, PDA, EMB, KF Streptococcus agar besiyerlerine damlatma yöntemiyle ekim yapılmıştır. MRS, M17, EMB, KF Streptococcus agara inoküle edilen örnekler %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 24-48 saat 37 °C'de, PCA besiyerine inoküle edilen örnekler 37 °C' de 48 saat aerobik etüvde, PDA besiyerine ekilen örnekler ise 28 °C'de 24-48 saat aerobik etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra besiyerlerinde oluşan koloniler sayılmıştır.

#### **2.2.12.4. Streptozotosin (STZ) uygulanması ve gavaj uygulaması**

2 gruba STZ uygulanmıştır. Bu gruplar; sadece STZ verilecek grup, STZ ve probiyotik verilecek gruptur. Toplam 12 hayvana sitrat tamponu (pH 4,5) içerisinde 40 mg/kg dozda STZ (1 ml/kg) hayvanlara enjekte edilmiştir (Tabuchi vd., 2003). STZ ile pankreasteki  $\beta$  hücrelerine hasar oluşturularak tip 1 diyabet modeli oluşturulmuştur. Hayvanlarda model oluşması için 30 gün beklenmiştir. STZ uygulanan gruplar 30 gün boyunca izlenmiştir. STZ uygulanan hayvanların hareketlerinde kısıtlanma, ağırlaşma

gözlemlenmiştir. Çok fazla yem yemeleri ve çok fazla su içmeleri kaydedilip bunun yanında aşırı idrar oluşturmaları kaydedilmiştir.

Hayvanlarda tip 1 diyabet modeli oluşturulduktan sonra gavaj aşamasına geçilmiştir. Probiyotik özelliği ve glikosidaz aktivitesi yüksek olan Grass (sağlık için tehlike içermeyen) laktik asit bakterisi (*Lactobacillus plantarum*) liyofilize edilmiştir. *Lactobacillus plantarum*  $10^{10}$ /ml olacak şekilde hayvanlara 30 gün boyunca her gün sabah, akşam gavaj yoluyla verilmiştir. Gavaj yapılan gruplar; sadece probiyotik verilen grup, STZ uygulanan-probiyotik verilecek olan gruptur.



**Görsel 2.2.** Hayvanlara gavaj uygulaması

#### **2.2.12.5. Kan parametreleri**

Deney süresi sonunda diseksiyonu yapılan 24 hayvanın kanları alınıp 10000 x g 'de 10 dakika santrifüj edilerek serum kısmı toplanmıştır. MST LAB tarafından alınan serumlar USCN Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit ile İnsülin ve USCN Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit ile Hemogloblin A1c (HbA1c) kan parametreleri hizmet alımıyla yapılmıştır (Yun vd., 2009).

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Laktik Asit Bakterilerinin İncelenmesi

Seçilen 62 laktik asit bakterisine gram boyama ve katalaz testi yapılmıştır. Kültürlerin hepsinin saf, gram pozitif (+) ve katalaz negatif (-) olduğu görülmüştür. 23 tanesi basil, 39 tanesi koktur. Test bakterilerinin kaynağı gram özelliği katalaz ve hücre şekli Tablo 3.1’ de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** İzolatların incelenmesi

İzolat no	Kaynak	Hücre şekli	Gram reaksiyon	Katalaz	İzolat no	Kaynak	Hücre şekli	Gram reaksiyon	Katalaz
TM11	İnsan	kok	(+)	(-)	TM8	İnsan	kok	(+)	(-)
TM6	İnsan	kok	(+)	(-)	K13	İnsan	kok	(+)	(-)
TM15	İnsan	kok	(+)	(-)	E12-2	peynir	kok	(+)	(-)
K14 LP	İnsan	kok	(+)	(-)	MRS3111-C	oral	basil	(+)	(-)
K6	İnsan	kok	(+)	(-)	TM18	İnsan	kok	(+)	(-)
G20	peynir	kok	(+)	(-)	LAB1.1.A	oral		(+)	(-)
K21	İnsan	kok	(+)	(-)	G41	peynir	kok	(+)	(-)
G38	peynir	kok	(+)	(-)	ÖZKA1	oral	basil	(+)	(-)
MRS312-C	oral	basil	(+)	(-)	D22	peynir	kok	(+)	(-)
M621-A	oral	basil	(+)	(-)	TM9	İnsan	kok	(+)	(-)
LAB6.1.A	oral	basil	(+)	(-)	TM2	İnsan	kok	(+)	(-)
LAB7.7	oral	basil	(+)	(-)	KM6	İnsan	kok	(+)	(-)
D16	peynir	kok	(+)	(-)	G30	peynir	kok	(+)	(-)
LAB6.1.B	oral	basil	(+)	(-)	TM7	İnsan	kok	(+)	(-)

**Tablo 3.1.** (Devam) *İzolatların incelenmesi*

izolat no	Kaynak	Hücre şekli	Gram reaksiyon	Katalaz	izolat no	Kaynak	Hücre şekli	Gram reaksiyon	Katalaz
M1743-C	oral	basil	(+)	(-)	E134-B	peynir	kok	(+)	(-)
D36	peynir	kok	(+)	(-)	MRS312	oral	basil	(+)	(-)
MRS312-A	oral	basil	(+)	(-)	TM13	insan	kok	(-)	(+)
D28	peynir	kok	(+)	(-)	MRS312-D	oral	basil	(-)	(+)
G22	peynir	kok	(+)	(-)	TM17Y	insan	kok	(-)	(+)
TN3	insan	kok	(+)	(-)	TM17	insan	kok	(-)	(+)
K20-2	insan	kok	(+)	(-)	MRS3111	oral	basil	(-)	(+)
K20-1	insan	kok	(+)	(-)	M1724-B	oral	basil	(-)	(+)
KM5	insan	kok	(+)	(-)	M1771	oral	basil	(-)	(+)
K9 LP	insan	kok	(+)	(-)	M1743-B	oral	basil	(-)	(+)
TM4	insan	kok	(+)	(-)	MRS312-B	oral	basil	(-)	(+)
G40	peynir	kok	(+)	(-)	M1724-A	oral	basil	(-)	(+)
K7 LP	insan	kok	(+)	(-)	M1743-A	oral	basil	(-)	(+)
M177126	oral	basil	(+)	(-)	D20	peynir	kok	(-)	(+)
TM3	insan	kok	(+)	(-)	D21	peynir	kok	(-)	(+)
E123	peynir	kok	(+)	(-)	M1743	oral	basil	(-)	(+)
M622	oral	basil	(+)	(-)	M1724	oral	basil	(-)	(+)

### 3.2. pH dirençliliği belirlenmesi

MRS ve M17 brotha 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 7, 8 pH' daki gelişim durumları belirlenmiştir. Tablo 3.2' de (+) olarak işaretlenen mikroorganizmaların gelişim gösterdiği belirtilmiştir. pH 1,5 ve 2,5 ta test bakterilerinin hiçbirinin gelişmediği gözlemlenmiştir (Tablo3.2). pH 2,5' ta MRS312, MRS312-D, MRS3111, M1724-B, M1771, M1743-B, MRS312-B, M1743-A numaraları izolatların besiyerinde geliştiği

görülmüştür (Tablo3.2). pH 3 ve 3,5 ta ise test bakterilerinin çoğu gelişmiştir. Bu bakterilerden 8 'i ( TM15, D16, TM17Y, D20, D21, M622, D22) gelişmemiştir. pH 7 ve 8 de bütün test bakterileri gelişmiştir.

**Tablo 3.2.** *pH dirençliliğinin belirlenmesi*

İzolat no	pH							
	1,5	2	2,5	3	3,5	4	7	8
TM11	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
TM6	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
TM15	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
K14 LP	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
K6	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
G20	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
K21	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
G38	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
MRS312-C	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
M621-A	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
LAB6.1.A	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
LAB7.7	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
D16	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
LAB6.1.B	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

**Tablo 3.2.** (Devam) pH dirençliliğinin belirlenmesi

İzolat no	pH							
	1,5	2	2,5	3	3,5	4	7	8
TM7	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
E134-B	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
MRS312	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
TM13	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
MRS312-D	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
TM17Y	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
TM17	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
MRS3111	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
M1724-B	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
M1771	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
M1743-B	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
MRS312-B	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
M1724-A	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
M1743-A	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
D20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
D21	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
M1743	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
M1724	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
M622	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
G30	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
KM6	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
TM2	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
TM9	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
D22	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
ÖZKA1	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
G41	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
LAB1.1.A	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
TM18	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)

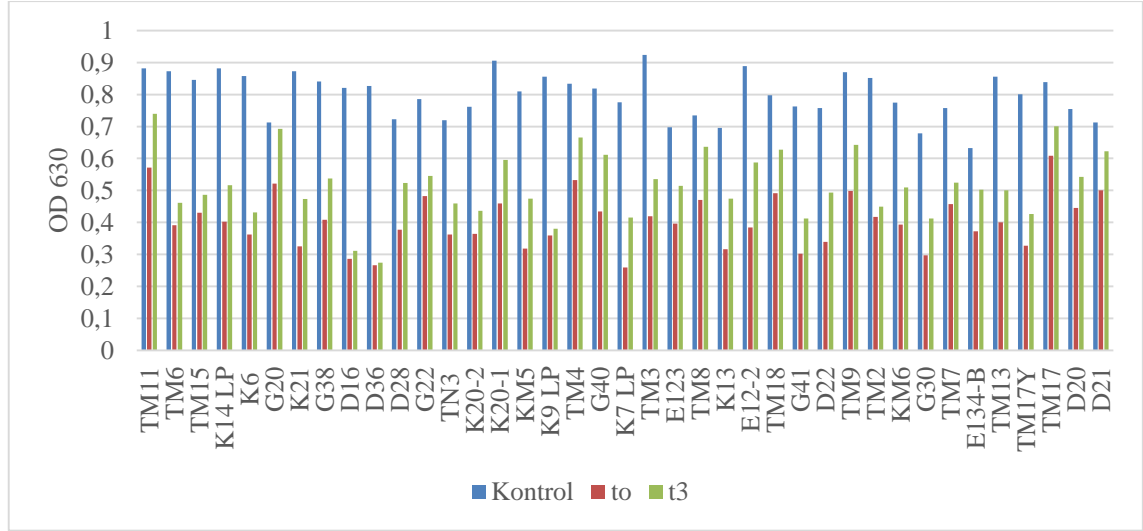
**Tablo 3.2.** (Devam) *pH dirençliliğinin belirlenmesi*

İzolat no	pH							
	1,5	2	2,5	3	3,5	4	7	8
K20-1	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
K20-2	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
KM5	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
K9 LP	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
TM4	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
G40	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
K7 LP	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
M177126	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
TM3	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
E123	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
TM8	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
K13	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
E12-2	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
MRS3111-C	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
M1743-C	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
D36	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
MRS312-A	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
D28	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
G22	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
TN3	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)

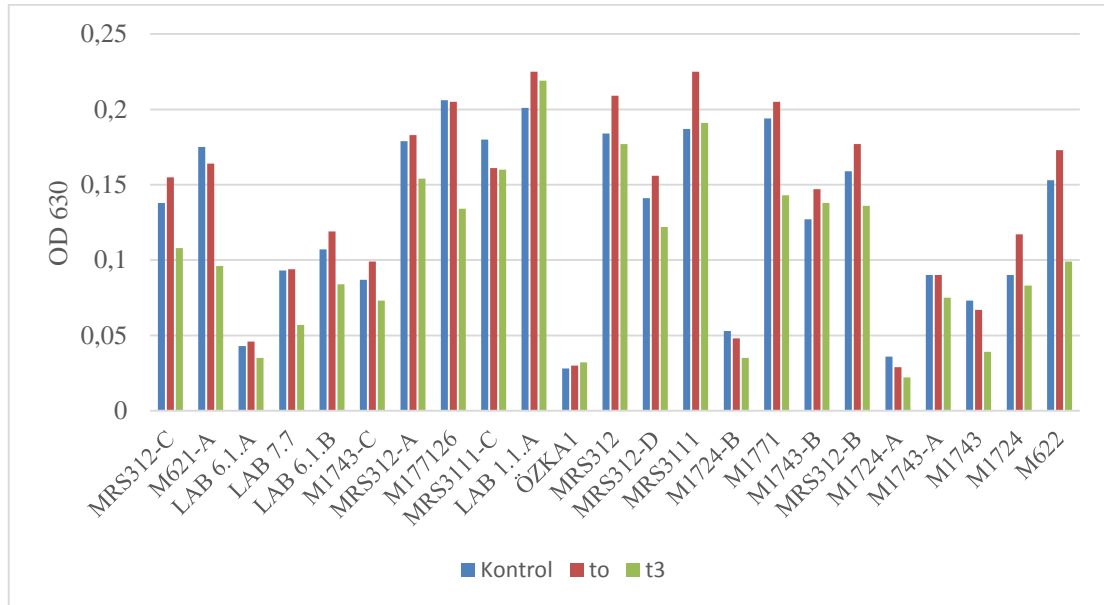
### 3.3. LAB' ların gastrointestinal şartlara direncinin belirlenmesi

#### 3.3.1. Safra tuzu (oxgall) direncinin belirlenmesi

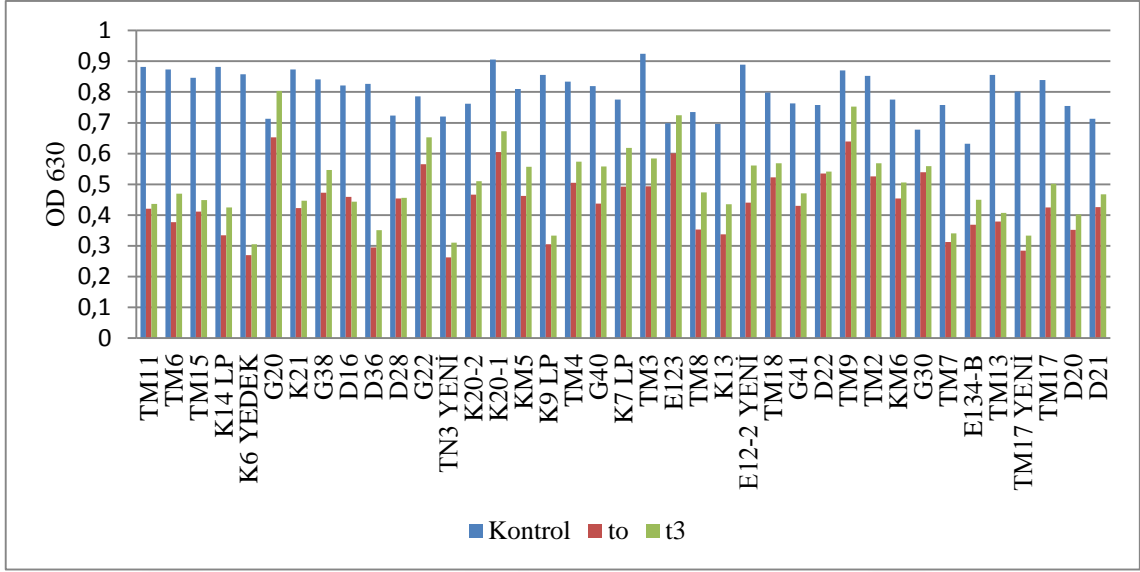
Laktik asit bakterilerinin farklı konsantrasyonlardaki safra tuzuna karşı göstermiş oldukları dirençleri kaydedilmiştir. Konsantrasyon arttıkça laktik asit bakterilerinin safra toleransının düştüğü gözlemlenmiştir.



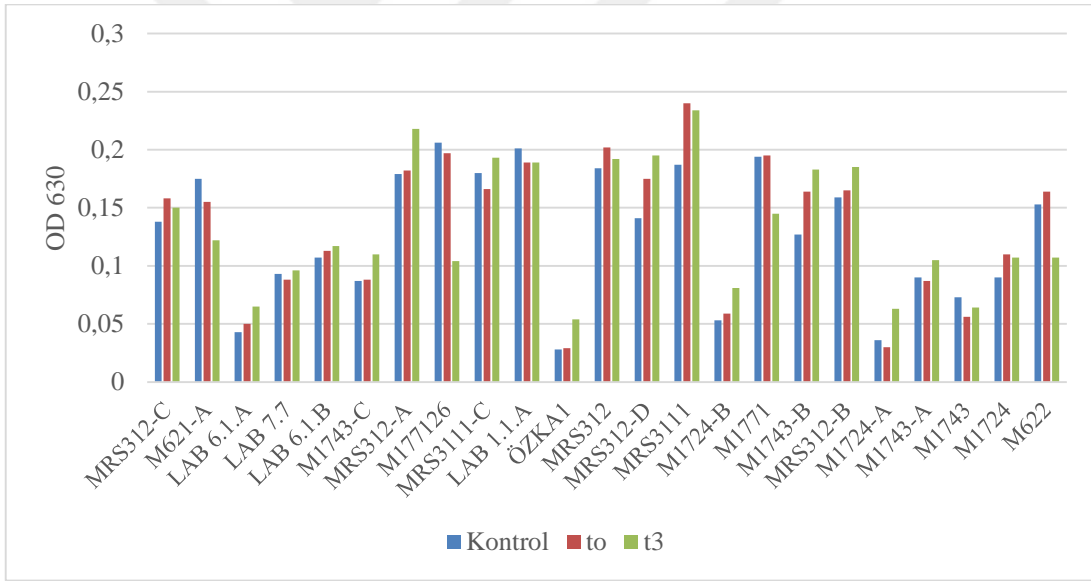
Şekil 3.1. M17 broth besiyerinde %0,3 safra tuzu (oxgall) 630 nm değerleri



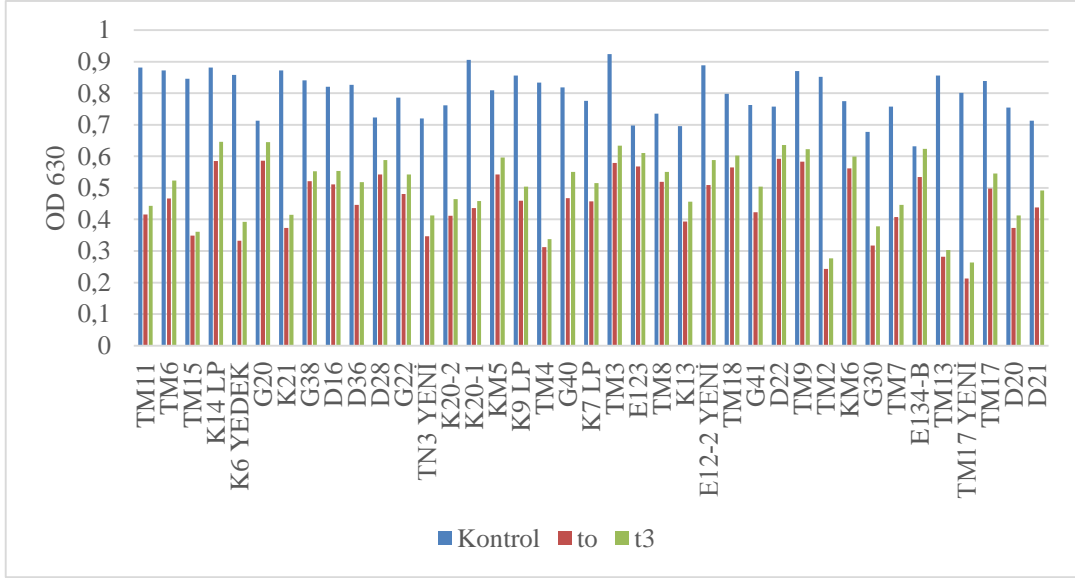
Şekil 3.2. MRS broth besiyerinde %0,3 safra tuzu (oxgall) 630 nm değerleri



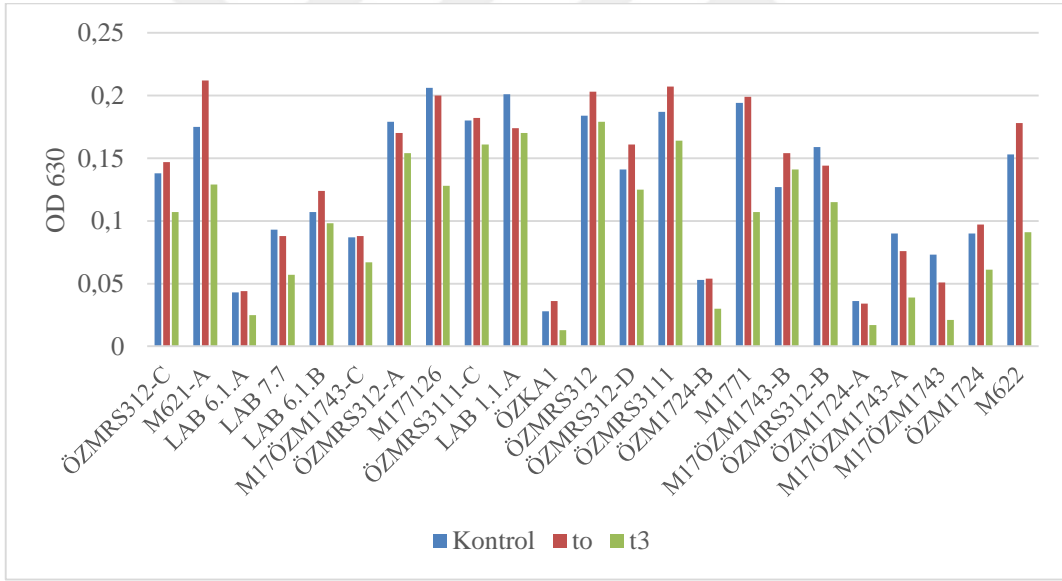
Şekil 3.3. M17 broth besiyerinde %0,6 safra tuzu (oxgall) 630 nm değerleri



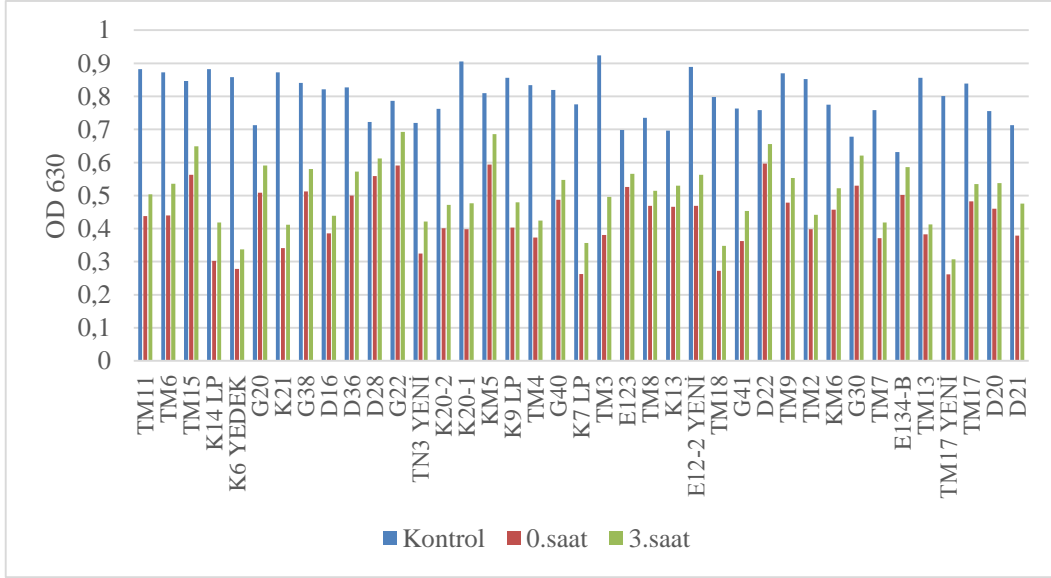
Şekil 3.4. MRS broth besiyerinde %0,6 safra tuzu (oxgall) 630 nm değerleri



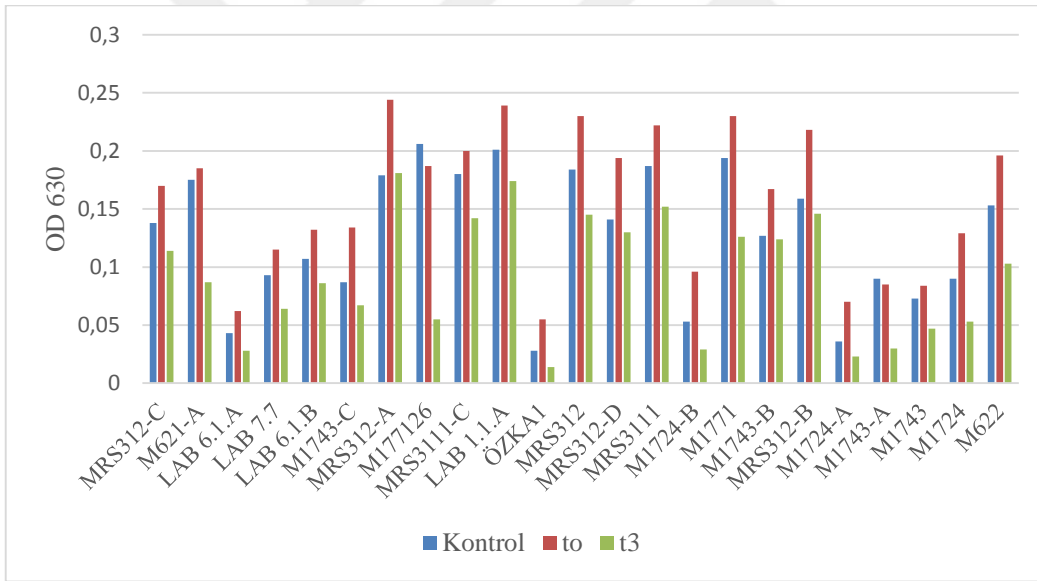
Şekil 3.5. M17 broth besiyerinde %1,25 safra tuzu (oxgall) 630 nm değerleri



Şekil 3.6. MRS broth besiyerinde %1,25 safra tuzu (oxgall) 630 nm değerleri



Şekil 3.7. M17 broth besiyerinde %2,5 safra tuzu (oxgall) 630 nm değerleri

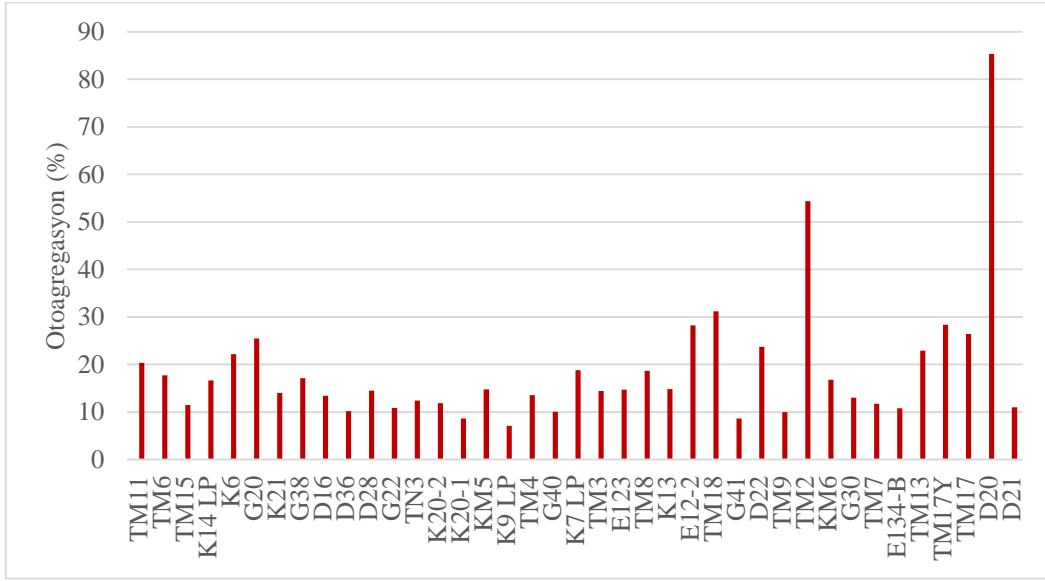


Şekil 3.8. MRS broth besiyerinde %2,5 safra tuzu (oxgall) 630 nm değerleri

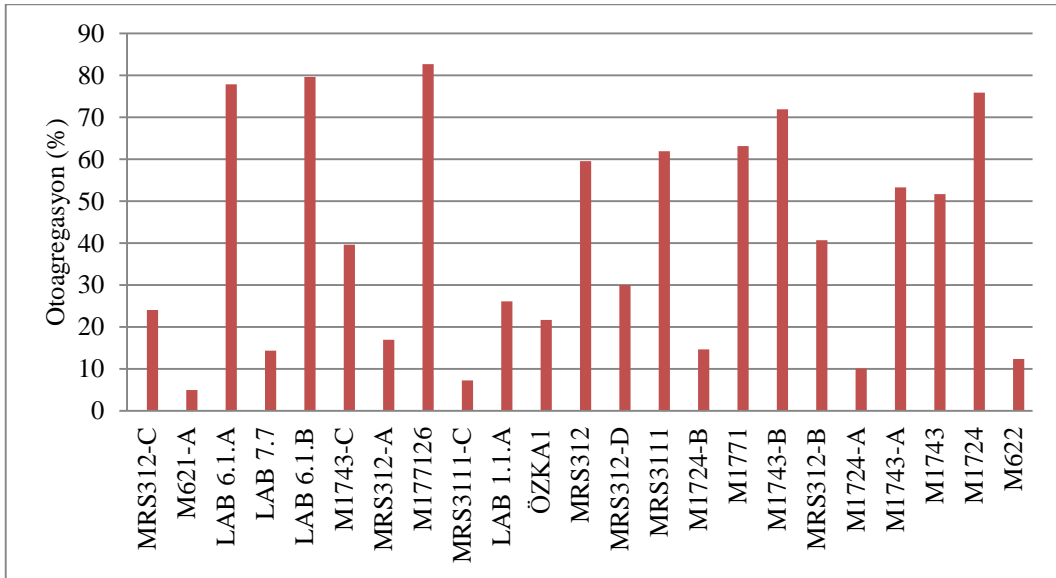
### 3.4. Laktik asit bakterilerinin agregasyon aktivitelerinin belirlenmesi

#### 3.4.1. Otoagregasyon aktivitesinin belirlenmesi

Test bakterilerinin otoagregasyon aktivitesi (%) Şekil 3.9 ve Şekil 3.10' da verilmiştir. Otoagregasyon yüzdesi en yüksek olan izolat % 85,36 ile D20 (Şekil 3.8), en düşük otoagregasyon aktivitesi gösteren izolat ise % 4,95 ile M621-A (Şekil 3.9) kodlu bakteridir.



Şekil 3.9. M17' de gelişen LAB' ların % otoagregasyon aktivite sonuçları



Şekil 3.10. MRS' de gelişen LAB' ların % otoagregasyon aktivite sonuçları

### 3.4.2. Koagregasyon aktivitesinin belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinin *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* bakterileri ile koagregasyon aktiviteleri incelenmiştir (Tablo3.3). *E. coli* patojeninde en yüksek koagregasyon aktivitesi sırasıyla % 80,91 (TM13), % 73,46 (K20-1), % 69,04 (G41), % 58,94 (G40) % 58,51 (K14 LP). 7 kültürde koagregasyon aktivitesine saptanmamıştır. *S. aureus* a karşı en yüksek koagregasyon aktivitesi sırasıyla % 63,54 (M1743-C), % 57,36 (LAB1.1.A), % 51,97 (MRS312-A), % 48,75 (LAB6.1.A), % 44,97 (G30). 31 kültürde koagregasyon aktivitesine saptanmamıştır.

**Tablo 3.3.** LAB' nin *E.coli* ve *S.aures* ile yüzde koagregasyon aktiviteleri

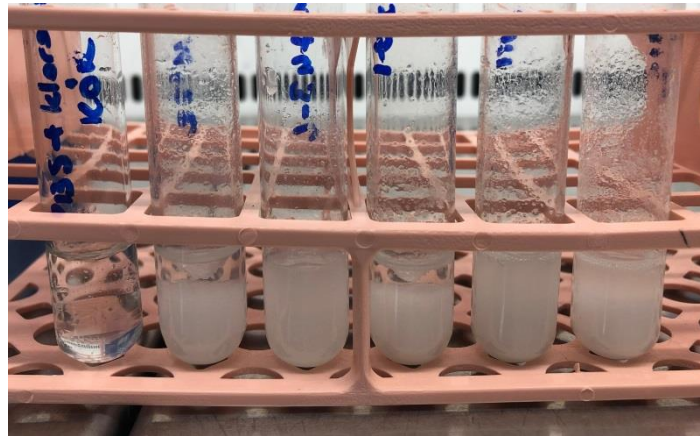
İzolot no	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	İzolot no	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>
TM11	47,61	(-)	TM8	43,09	(-)
TM6	52,59	(-)	K13	42,88	(-)
TM15	49,84	(-)	E12-2	42,61	(-)
K14 LP	58,51	(-)	MRS3111-C	(-)	8,54
K6	32,19	(-)	TM18	1,92	26,26
G20	56,15	(-)	LAB1.1.A	(-)	57,36
K21	23,02	(-)	G41	69,04	(-)
G38	48,61	(-)	ÖZKA1	6,87	38,24
MRS312-C	17,39	40,79	D22	(-)	22,63
M621-A	5,73	29,81	TM9	35,25	(-)
LAB6.1.A	(-)	48,75	TM2	53,58	(-)
LAB7.7	(-)	35,91	KM6	31,52	(-)
D16	6,88	17,87	G30	12,23	44,97
LAB6.1.B	8,51	2,24	TM7	(-)	(-)
M1743-C	27,35	63,54	E134-B	32,27	(-)
D36	10,13	22,13	MRS312	26,73	35,09

**Tablo 3.3.** (Devam) LAB' nin *E.coli* ve *S.aureus* ile yüzde koagregasyon aktiviteleri

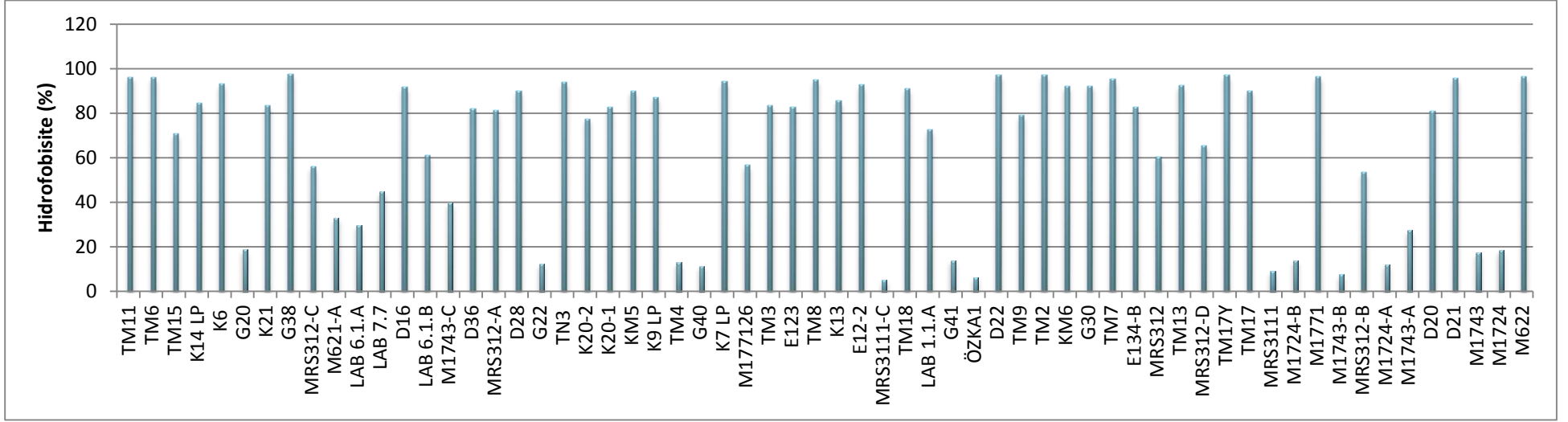
İzolat no	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	İzolat no	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>
K20-2	31,39	(-)	ÖZMRS3111	7,82	61,31
K20-1	73,46	(-)	ÖZM1724-B	18,12	30,22
KM5	39,71	(-)	M1771	40,14	10,26
K9 LP	28,88	(-)	M17ÖZM1743-B	18,75	40,34
TM4	3,52	17,75	ÖZMRS312-B	35,97	62,14
G40	58,94	(-)	ÖZM1724-A	14,67	34,95
K7 LP	36,67	(-)	M17ÖZM1743-A	33,75	8,28
M177126	(-)	23,18	D20	30,79	13,12
TM3	24,83	(-)	D21	10,87	26,47
E123	65,9	(-)	M17ÖZM1743	26,95	36,79
M622	(+)	(-)	ÖZM1724	6,13	20,86
G22	40,48	(-)	TM17 YENİ	23,73	(-)
TN3 YENİ	32,89	(-)	TM17	51,28	(-)
ÖZMRS312-A	5,79	51,97	TM13	80,91	(-)
D28	18,17	14,44	ÖZMRS312-D	9,14	42,44

### 3.5. Laktik asit bakterilerinin hücre-yüzey hidrofobisitesi

Laktik asit bakterilerinin % hidrofobisitesi Şekil 3.11. de verilmiştir. En yüksek hidrofobisite oranı % 97,01 ile D22 kodlu izolattır. En düşük hidrofobisite oranı ise % 5,14 ile MRS3111-C kodlu izolattır.



**Görsel 3.1.** Laktik asit bakterilerinin kloroforma karşı hidrofobisitesi



Şekil 3.11. Laktik asit bakterilerinin kloroform çözücüsüne affinite yüzdesi (% hidrofobisite)

### 3.6. Laktik asit bakterilerinin laktik asit üretiminin belirlenmesi

Laktik asit üretimi titrasyon yöntemi ile belirlenmiştir. İzolatların % laktik asit üretim miktarı formüle göre hesaplanıp Tablo 3.4’ de gösterilmiştir. % 0,0126 ile % 0,0576 arasında laktik asit üretimi bulunmuştur.

**Tablo 3.4.** Laktik asit üretimi (%)

İzolat no	Laktik asit (%)	İzolat no	Laktik asit (%)	İzolat no	Laktik asit (%)	İzolat no	Laktik asit (%)
TM11	0,0414	TM8	0,0378	TM4	0,0324	MRS3111	0,0468
TM6	0,036	K13	0,0432	G40	0,0306	M1724-B	0,0198
TM15	0,036	E12-2	0,0234	K7 LP	0,0378	M1771	0,0198
K14 LP	0,045	MRS3111-C	0,0468	M177126	0,0126	M1743-B	0,027
K6	0,0378	TM18	0,0342	TM3	0,0468	TN3	0,036
G20	0,0198	LAB1.1.A	0,0288	E123	0,036	TM17Y	0,0396
K21	0,0414	G41	0,0288	M622	0,0396	TM17	0,036
G38	0,0414	ÖZKA1	0,036	MRS312-B	0,0576	G22	0,0342
MRS312-C	0,0576	D22	0,027	M1724-A	0,0297	D28	0,0198
M621-A	0,0288	TM9	0,0396	M1743-A	0,0252	MRS312-D	0,0576
LAB6.1.A	0,036	TM2	0,0396	D20	0,027	K9 LP	0,054
LAB7.7	0,0468	KM6	0,045	D21	0,0252	MRS312-A	0,0738
D16	0,0378	G30	0,0288	M1743	0,027	TM13	0,036
LAB6.1.B	0,054	TM7	0,045	M1724	0,0288	KM5	0,0288
M1743-C	0,027	E134-B	0,036	K20-2	0,0486	K20-1	0,036
D36	0,045	MRS312	0,0594				



Görsel 3.2. Titrasyon işlemindeki renk değişimi

### 3.7. Laktik asit bakterilerinin süpernatantlarının antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinin *Klebsiella Pneumoniae*, *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas*, *Candida albicans*, *Bacillus cereus* patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivite sonuçları Tablo 3.5 de verilmiştir. *Klebsiella Pneumoniae*'a karşı en yüksek 13 mm çapında zon görülmüştür (M1743-B) ve 7 kültürde zon oluşumu gözlemlenmemiştir. *E.coli*'a karşı en yüksek 14 mm zon (M622, M1743-B, LAB1.1.A) ve 8 kültürde zon oluşumu gözlemlenmemiştir. *S. aureus*'a karşı 17 mm çapında zon (LAB1.1.A) oluşumu gözlemlenmiştir. *B. cereus*' ta sadece LAB1.1.A kodlu izolatta zon çapı görülmüştür. *C. albicans*' ta hiçbir laktik asit bakterisi zon oluşturmamıştır.

Tablo 3.5. LAB' ların antibakteriyal aktivitelerinin zon çapları (mm)

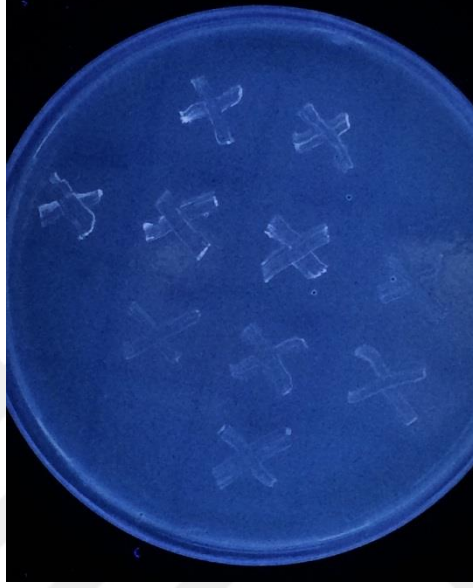
İzolant no	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>B. cereus</i>
MRS312-C	12	12	14	14	4	12	(-)
M621-A	12	11	(-)	12	(-)	11	(-)
LAB6.1.A	12	11	11	12	4	11	(-)

**Tablo 3.5.** (Devam) *LAB' ların antibakteriyal aktiviteilerinin zon çapları (mm)*

<i>izolat no</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>B. cereus</i>
LAB7.7	12	11	12	14	4	11	(-)
LAB6.1.B	12	12	13	15	3	12	(-)
M1743-C	12	11	11	12	4	11	(-)
MRS312-A	11	12	13	13	3	13	(-)
M177126	11	10	(-)	(-)	(-)	11	(-)
MRS3111-C	12	13	12	14	(-)	11	(-)
LAB1.1.A	12	14	17	17	(-)	14	12
ÖZKA1	12	11	(-)	14	(-)	13	(-)
MRS312	13	13	15	16	3	14	(-)
MRS312-D	11	12	14	14	(-)	14	(-)
MRS3111	11	12	14	14	4	11	(-)
M1724-B	10	12	11	12	(-)	10	(-)
M1771	11	12	11	12	(-)	12	(-)
M1743-B	13	14	16	16	4	16	(-)
MRS312-B	12	11	12	14	4	12	(-)
M1724-A	12	(-)	(-)	14	4	11	(-)
M1743-A	12	12	14	13	(-)	(-)	(-)
M1743	11	11	11	12	(-)	10	(-)
M1724	11	11	11	14	(-)	11	(-)
M622	12	14	13	13	(-)	(-)	(-)
D20	(-)	(-)	(-)	(-)	6	(-)	(-)
D21	(-)	(-)	(-)	(-)	5	(-)	(-)
TM6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
M622	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	12	(-)
TM13	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
TM2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	10	(-)
TM17	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

### 3.8. Lipolitik aktivite

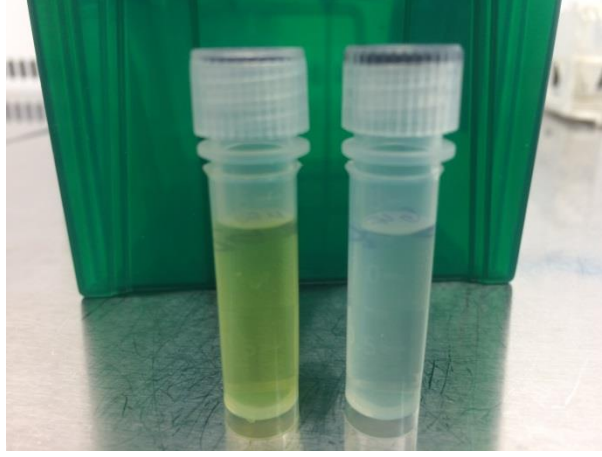
Lipolitik aktivitede test etmek için yapılan deneyde test edilen laktik asit bakterilerinde lipolitik aktivite olmadığı belirlenmiştir. Petriler UV'de 350 nm de incelenmiştir ve hiçbir bakteride ışımaya görülmemiştir.



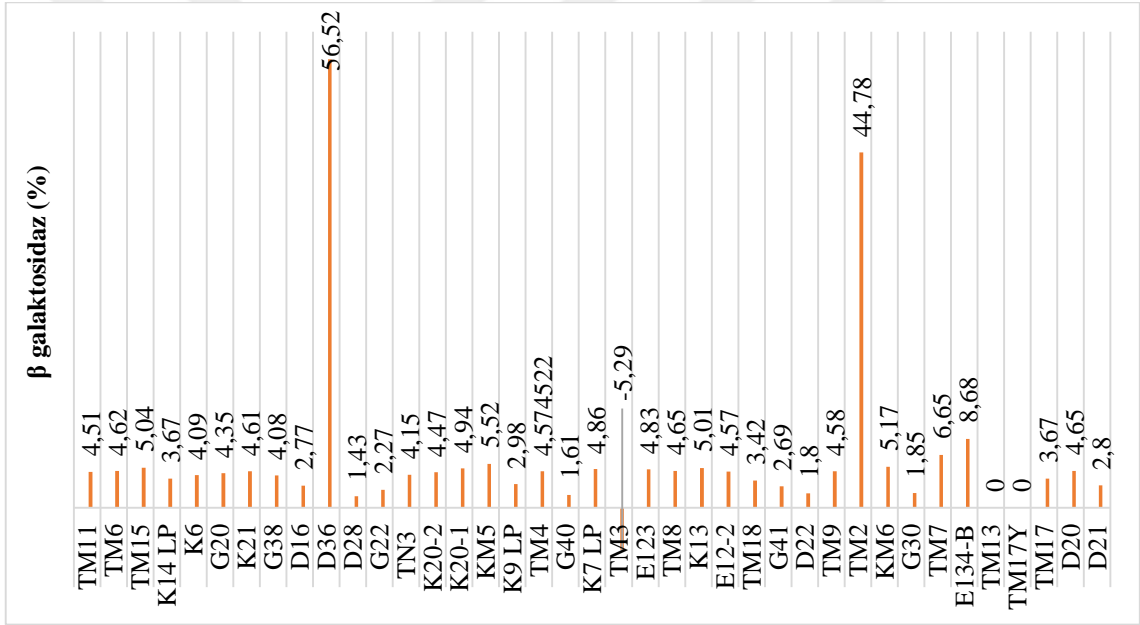
Görsel 3.3. UV' de 350 nm de incelenen LAB'ların ışımaları

### 3.9. $\beta$ -galaktosidaz aktivitesinin belirlenmesi

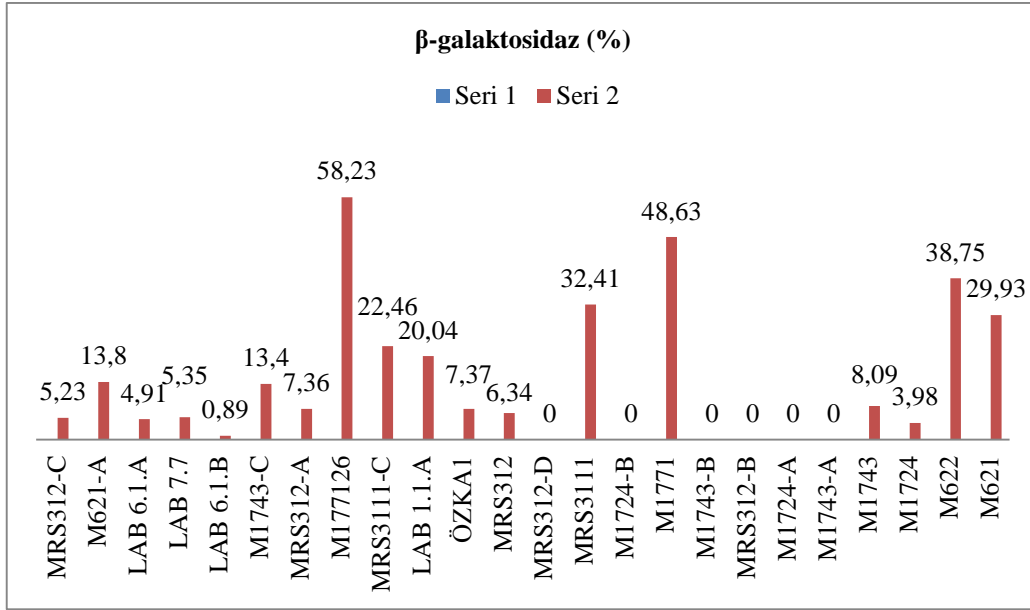
B-galaktosidaz aktivitesinin belirlenmesinde, o-nitrophenyl-beta-D-galactoside' in (ONPG) ayrışmasını katalize eden beta-galaktosidaz enziminin varlığının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Galaktosidaz pozitif olan bakterilerde, renksiz olan ONPG hidrolize edilerek sarı kromojenik bir madde olan O-nitrofenol (ONP) serbest kalır. Serbest kalan o-nitrofenol alkali solusyonda sarı renk meydana getirir. Pozitif reaksiyon oluşması laktozun fermente olduğunu göstermektedir.



**Görsel 3.4.**  $\beta$ -galaktosidaz enziminin varlığıyla ortamın sarı rene dönüşmesi



**Şekil 3.12.** M17 brothta LAB'ların  $\beta$ -galaktosidaz aktivite sonuçları



Şekil 3.13. MRS brothta gelişme gösteren LAB'ların β-galaktosidaz aktivite sonuçları

### 3.10. Kolesterol asimilasyonunun belirlenmesi

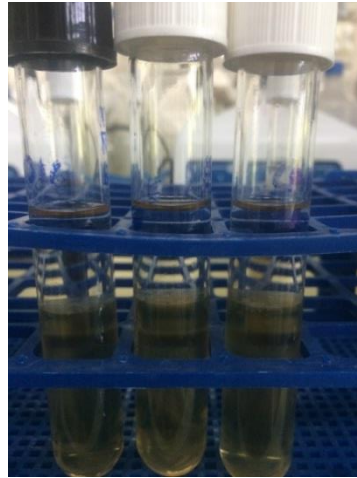
Laktik asit bakterilerinin kolesterol asimilasyonu Tablo 3.7' de verilmiştir. Kültürlerin çoğu % kolesterol asimilasyonu yüksek olduğu saptanmıştır. En yüksek % asimilasyon % 98,74 (M172 ve M177126), % 97,55 (LAB7.7, M1724-A, M1743-A), % 95,17 (M312-D, LAB6.1.B), % 90,30 (M312). En düşük %38,41 (D36)' dir. 15 izolatın kolesterolü asimile edemediği saptanmıştır.

Tablo 3.7. LAB'ların kolesterol asimilasyon sonuçları(%)

İzolasyon no	Asimilasyon (%)	İzolasyon no	Asimilasyon (%)
TM11	77,02	TM18	47,61
TM6	-	LAB 1.1.A	-
TM15	68,11	G41	-
K14 LP	60,82	ÖZKA1	60,84
K6	62,13	D22	52,02
G20	-	TM9	86,92
K21	53,26	TM2	62,13
G38	55,55	KM6	55,55
MRS312-C	90,40	G30	46,14
M621-A	-	TM7	49,30

**Tablo 3.7.** (Devam) *Laktik asit bakterilerinin kolesterol asimilasyon sonuçları (%)*

İzolat no	Asimilasyon (%)	İzolat no	Asimilasyon (%)
LAB 6.1.A	78,50	E134-B	79,24
LAB 7.7	97,55	MRS312	90,30
D16	36,43	TM13	50,29
LAB 6.1.B	95,17	MRS312-D	95,17
M1743-C	-	TM17Y	-
D36	38,41	TM17	50,29
MRS312-A	-	MRS3111	-
D28	41,38	M1724-B	-
G22	59,20	M1771	77,02
TN3	50,29	M1743-B	-
K20-2	61,18	MRS312-B	95,17
K20-1	68,11	M1724-A	97,55
KM5	55,55	M1743-A	97,55
K9 LP	61,18	D20	-
TM4	54,96	D21	63,78
G40	-	M1743	90,40
K7 LP	82,90	M1724	98,74
M177126	98,74	M622	71,14
TM3	48,31	E12-2	-
E123	-	MRS3111-C	75,55
TM8	75,55		
K13	82,90		

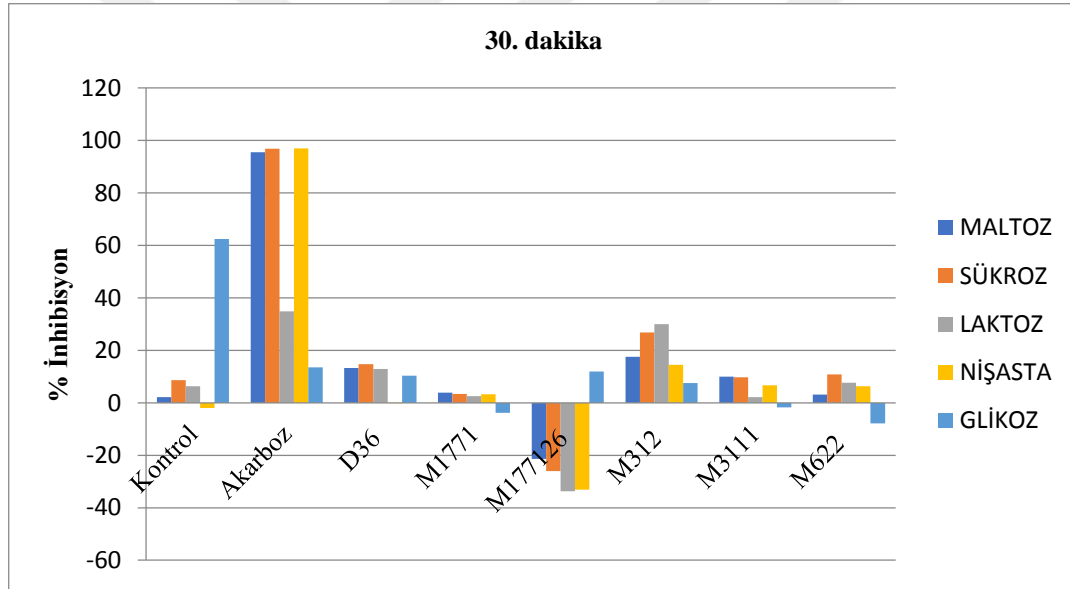


**Görsel 3.5.** *Distile su ve hekzanla muamele edildikten sonra 3 faz oluşumu*

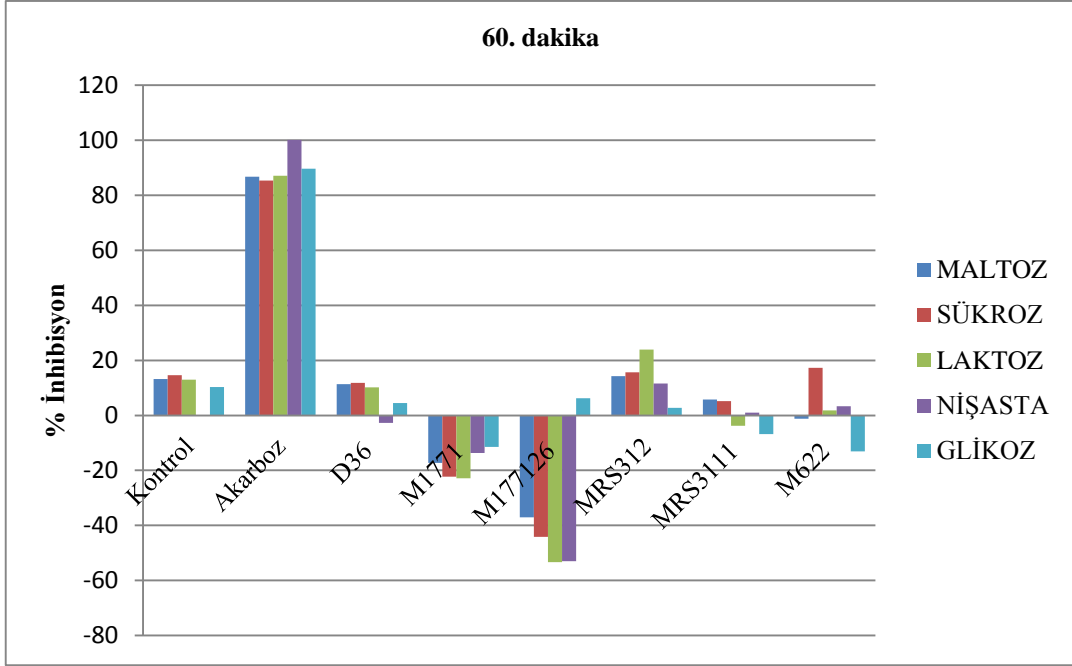
### 3.11. Glikosidaz aktivitesinin belirlenmesi

LAB'ların bakteri hücre lizatı ve süpernatanın 30., 60., 90. dakikalarda glikosidaz aktivitesi belirlenmiştir. Probiyotik özelliği yüksek olan 6 izolatla çalışılmıştır (D36, M1771, M177126, M3111, M622). 30. 60., ve 90. dakikalarda Süpernatan ve bakteri hücre lizatında glikosidazı en yüksek yüzde inhibisyon değerini veren MRS312 (*Lactobacillus rhamnosus*) kodlu izolat olduğu saptanmıştır. MRS312 30. dakikada %29, 60. dakikada %24, 90. dakikada %22 inhibisyon saptanmıştır. Süpernatana yapılan çalışmada M177126 izolatı glikosidazı inhibe edemediği belirlenmiştir.

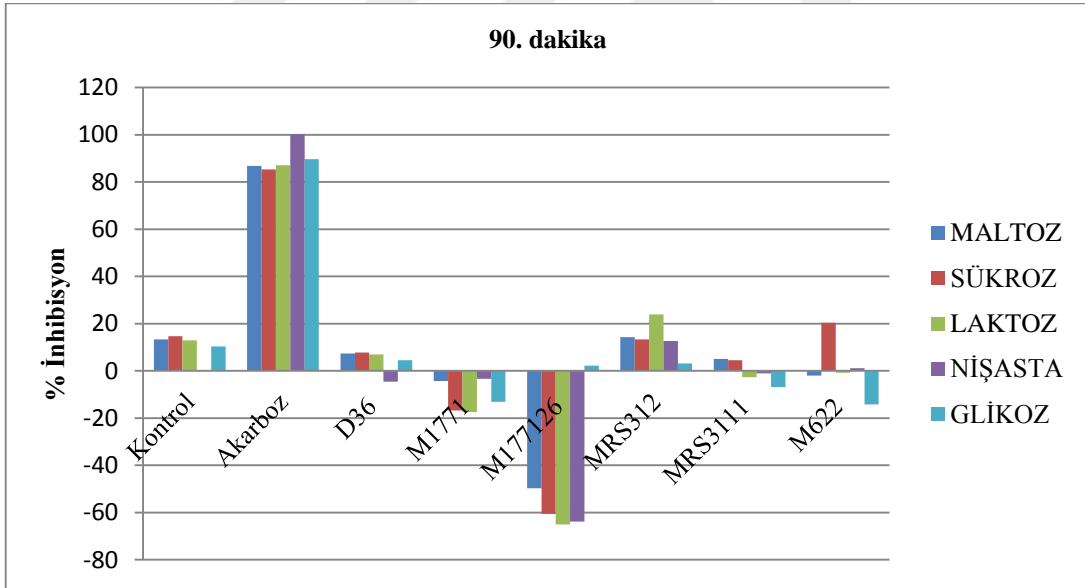
Bakteri hücre lizatında en yüksek M312' de inhibisyon olduğu belirlenmiştir. M622' de glikosidazı inhibe edemediği saptanmıştır.



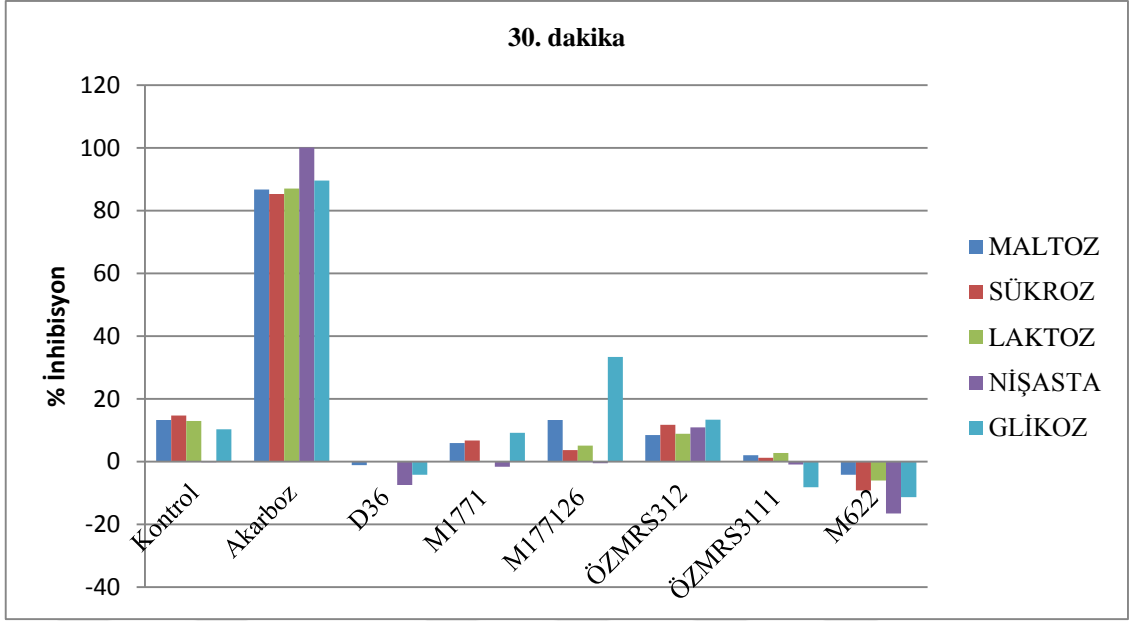
Şekil 3.14. Süpernatanın 30. dakikadaki % inhibisyonu



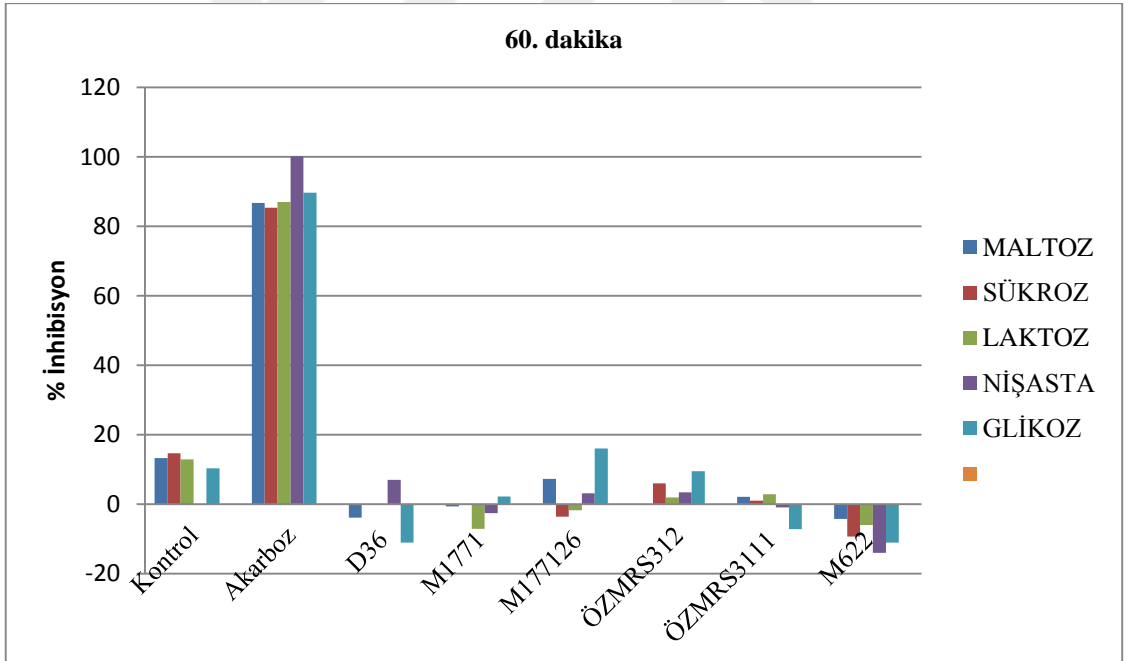
Şekil 3.15. Süpernatanın 60. dakikaki % inhibisyonu



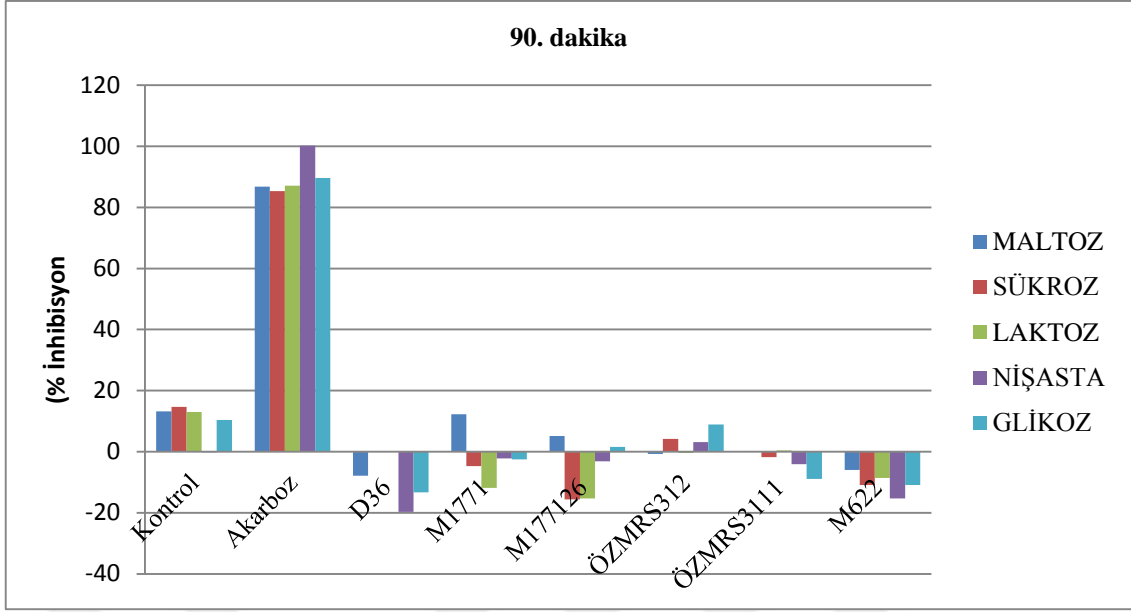
Şekil 3.16. Süpernatanın 90. dakikaki % inhibisyonu



**Şekil 3.17.** Bakteri hücre lizatının 30. dakikaki % inhibisyonu



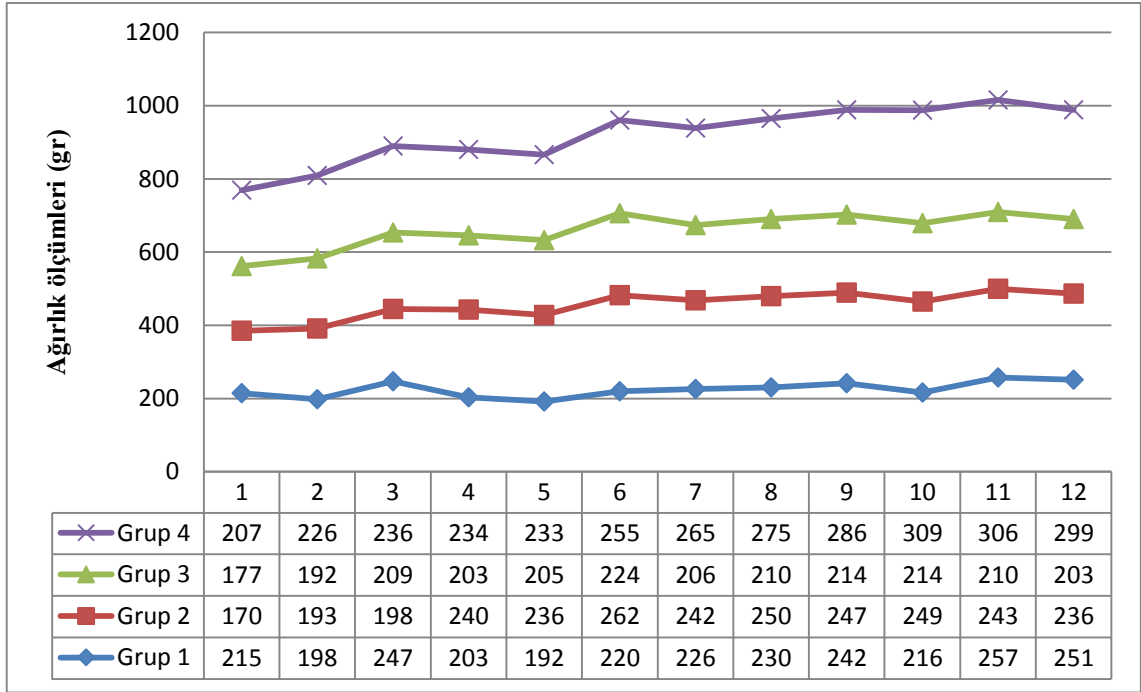
**Şekil 3.18.** Bakteri hücre lizatının 60. dakikaki % inhibisyonu



**Şekil 3.19.** Bakteri hücre lizatının 90. dakikaki % inhibisyonu

### 3.12. Hayvan deneyleri sonuçları

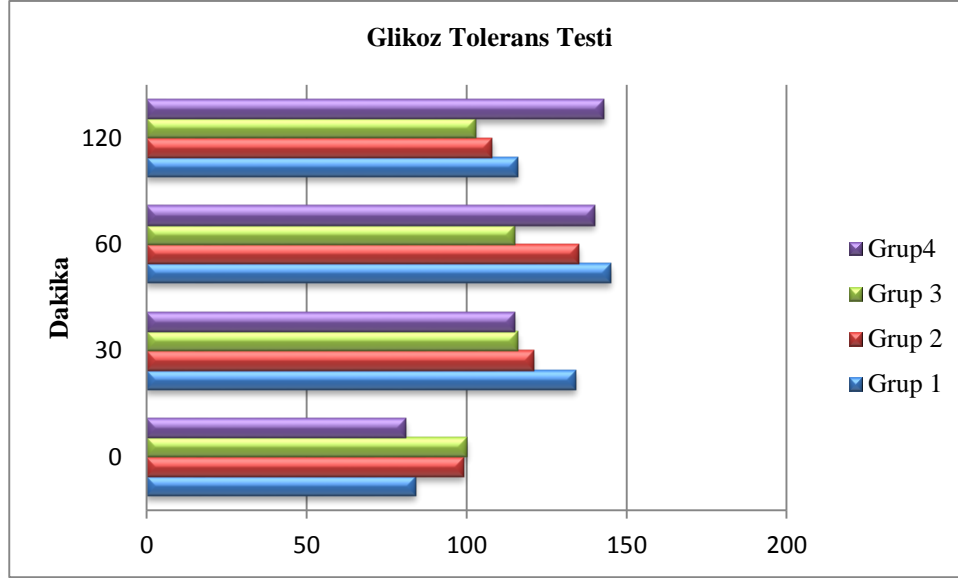
Sprague Dawley cinsi 4 haftalık erkek rat alınmıştır. Alınan bu hayvanların ilk olarak vücut ağırlıklarına bakılmıştır. 1 ay beslendikten sonra Şekil 3.20 de belirtilen Vücut ağırlıklarında belirli zaman aralıklarında düşüşler ve inişler görülmektedir.



Şekil 3.20. Hayvanların vucüt ağırlıkları. Grup 1: kontrol, Grup 2: STZ, Grup 3: STZ +probiyotik, Grup 4: probiyotik.

### 3.12.1. Glikoz tolerans testi sonucu

Hayvanlara hiçbir işlem uygulamadan önce glikoz tolerans testine bakılmıştır. Şeker yüklemesi yapıp 0., 30., 60., 120. dakikalarda glukoz tolerans testi şeker ölçüm cihazı ile test edilmiştir. Şekil 3.21' de gösterilmektedir. 0. dakikada grup 1'de 84 mg/dl, grup 2'de 99 mg/dl, grup 3'te 100 mg/dl, grup 4'te 81 mg/dl. 30. dakikada grup 1'de 134 mg/dl, grup 2'de 121 mg/dl, grup 3'te 116 mg/dl, grup 4'te 115 mg/dl. 60. dakikada grup 1'de 145 mg/dl, grup 2'de 135 mg/dl, grup 3'te 115 mg/dl, grup 4'te 140 mg/dl. 120. dakikada grup 1'de 116 mg/dl, grup 2'de 108 mg/dl, grup 3'te 103 mg/dl, grup 4'te 143 mg/dl olduğu belirlenmiştir.



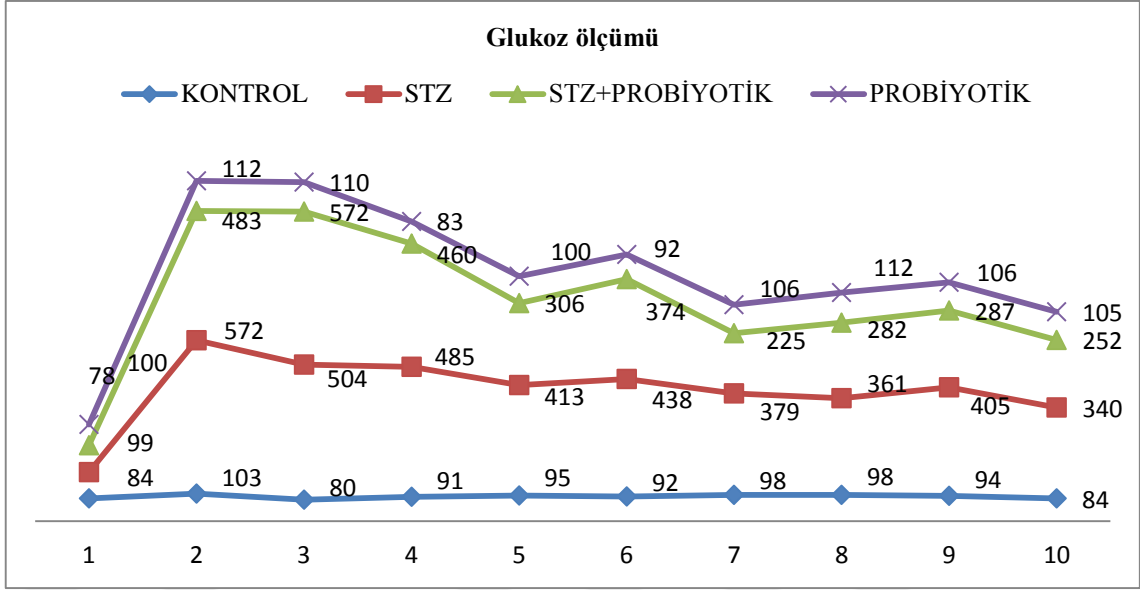
Şekil 3.21. Glikoz tolerans testi sonucu (mg/dl). Grup 1: kontrol, Grup 2: STZ, Grup 3: STZ+probiyotik, Grup 4: probiyotik.

### 3.12.2. Glukoz ölçümleri, su ve yem tüketimleri

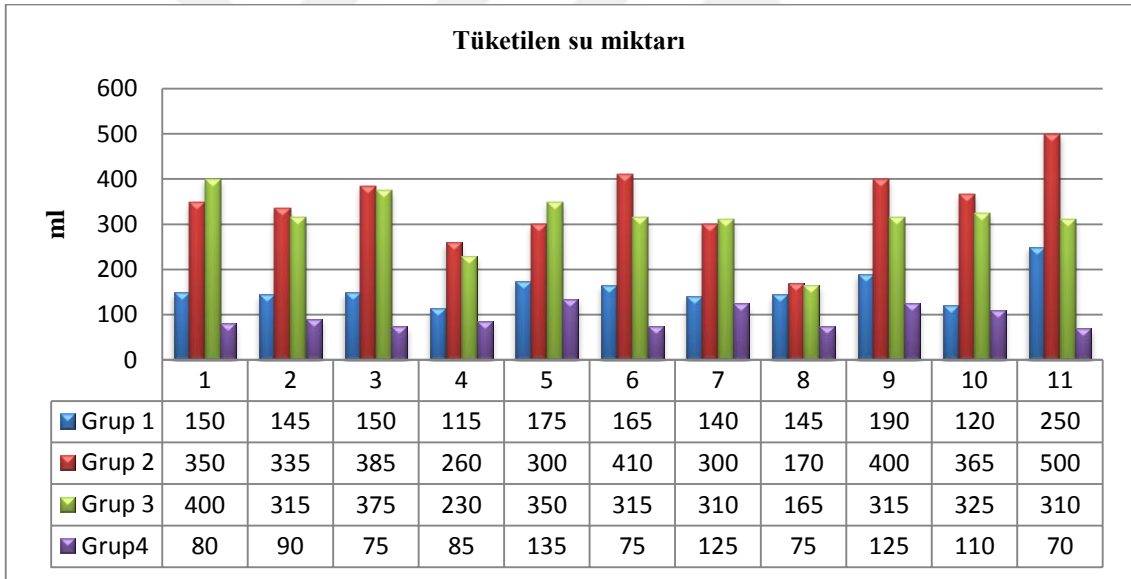
STZ ile hastalık sürecine sokulan hayvanlarda glukoz ölçümleri 114 mg/dl ile 600 mg/dl arasında seyretmiştir. 6. haftada 12 hayvana  $10^{10}$  kob/gr olacak şekilde *Lactobacillus rhamnosus* (M312 kodlu kültür) gavaj ile verilmeye başlanmıştır. Gavaj yapılan hasta grupların glukoz seviyeleri 225 mg/dl ye kadar düştüğü saptanmıştır.

Kontrol grubunun su tüketimi 120-250 ml arasında iken STZ’li gruplar 170-500 ml arasındadır. Fakat probiyotik verilen hasta gruplarda 165-325 ml arasında olduğu belirlenmiştir.

Kontrol grubunun yem tüketimi 56-79 gr, STZ’li grubun 132-77 gr, probiyotik verilen hasta gruplarda yem tüketimi ise probiyotik verilmeden önce 127-108 gr iken probiyotik verilmeye başlandıktan sonra 90-94 gr arasında değişmektedir.



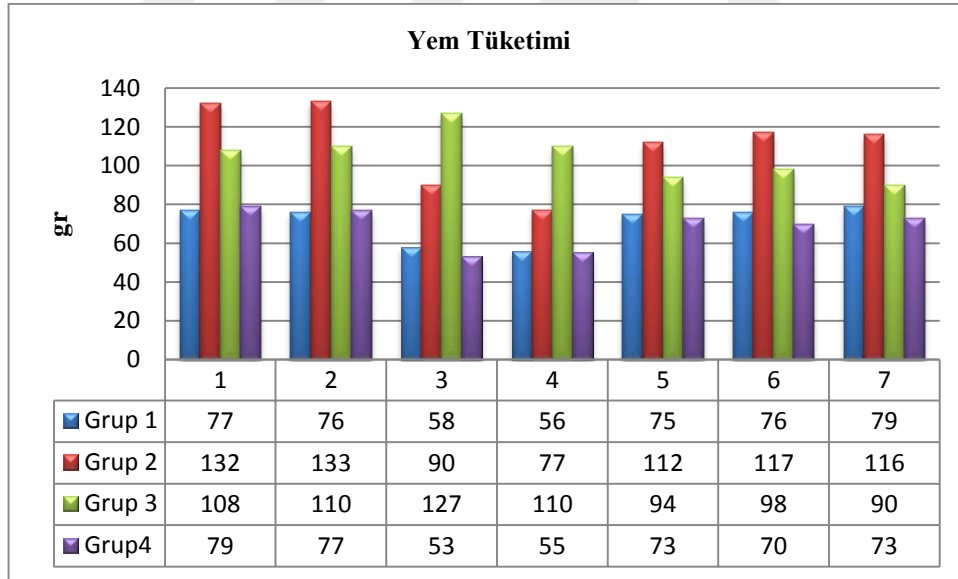
Şekil 3.22. Haftalık glukoz ölçümleri (mg/dl).



Şekil 3.23. Hayvanların tükettiği su miktarı. Grup 1: kontrol, Grup 2: STZ, Grup 3: STZ+probiyotik, Grup 4: probiyotik.



**Görsel 3.6.** Model oluşan gruplarda yem tüketimi



**Şekil 3.24.** Hayvanların tükettiği yem miktarı. Grup 1: kontrol, Grup 2: STZ Grup 3: STZ+probiyotik, Grup 4: probiyotik.

### 3.12.3. Dışkıda ve duodenumda bakteri sayımı sonucu

Tablo 3.8 'de hayvanlara hiçbir işlem uygulanmadan önce 1 gr daki dışkıda bakteri sayımları verilmiştir. KF streptococcus ve EMB besiyerinde Kontrol ve STZ grubunda üreme görülmemiştir. MRS ve PCA besiyerinde 4 gruptaki dışkılarda koloni

sayıları tespit edilmiştir. Her hafta dışkıda bakteri sayımı yapıp Tablo 3.9, Tablo 3.10, Tablo 3.11, Tablo 3.12’de verilmiştir.

Tablo 3.13’ de diseksiyonu yapılan hayvanlardan alınan duodenumdan bakteri sayımı verilmiştir. KF streptococcus besiyerinde gelişme olmadığından dolayı koloni sayımı yapılamamıştır. PDA besiyerinde yoğun bir gelişmeden dolayı koloniler sayılamamıştır.

**Tablo 3.8.** Dışkıda İlk bakteri sayımları(kob/gr)

Grup ismi	Gruplar	KF Streptococcus	EMB	PCA	MRS
Kontrol	1	-	-	-	$38 \times 10^7$ kob/gr
	2	-	-	-	$13,8 \times 10^6$ kob/gr
STZ	1	-	-	+	$93,3 \times 10^6$ kob/gr
	2	-	-	+	$69,3 \times 10^5$ kob/gr
STZ+Probiyotik	1	$96,0 \times 10^4$ kob/gr	+	$11,0 \times 10^4$ kob/gr	$39,6 \times 10^6$ kob/gr
	2	-	-	-	$10,7 \times 10^4$ kob/gr
Probiyotik	1	-	-	$22,0 \times 10^3$ kob/gr	$19 \times 10^6$ kob/gr
	2	$33,0 \times 10^{10}$ kob/gr	-	$46,0 \times 10^5$ kob/gr	$8,0 \times 10^6$ kob/gr

**Tablo 3.9.** Probiyotik verildikten sonra 1. haftadaki bakteri sayımı(kob/gr)

Grup ismi	Gruplar	KF Streptococcus	EMB	PCA	MRS	M17
Kontrol	1	$30,0 \times 10^1$ kob/gr	-	$13,3 \times 10^6$ kob/gr	$6,0 \times 10^6$ kob/gr	$66,0 \times 10^8$ kob/gr
	2	$29,0 \times 10^2$ kob/gr	-	-	$23,3 \times 10^6$ kob/gr	$36,6 \times 10^7$ kob/gr
STZ	1	$54,0 \times 10^2$ kob/gr	-	$33,0 \times 10^7$ kob/gr	$1,0 \times 10^6$ kob/gr	$34,0 \times 10^6$ kob/gr
	2	-	-	$33,0 \times 10^7$ kob/gr	$5,0 \times 10^6$ kob/gr	$3,0 \times 10^6$ kob/gr
STZ+Probiyotik	1	$34,0 \times 10^2$ kob/gr	-	$0,33 \times 10^5$ kob/gr	$2,0 \times 10^6$ kob/gr	$32,0 \times 10^5$ kob/gr

**Tablo 3.9.** (Devam) Probiyotik verildikten sonra 1. haftadaki bakteri sayımı(kob/gr)

Grup ismi	Gruplar	KF Streptecoccus	EMB	PCA	MRS	M17
	2	-	-	-	13,3×10 <sup>6</sup> kob/gr	29,3×10 <sup>6</sup> kob/gr
Probiyotik	1	39,0×10 <sup>2</sup> kob/gr	-	-	33,0×10 <sup>8</sup> kob/gr	33,0×10 <sup>7</sup> kob/gr
	2	-	-	2,0×10 <sup>5</sup> kob/gr	2,0×10 <sup>6</sup> kob/gr	56,6×10 <sup>6</sup> kob/gr

**Tablo 3.10.** Probiyotik verildikten sonra 2. haftadaki bakteri sayım (kob/gr)

Grup ismi	Gruplar	KF Streptecoccus	EMB	PCA	MRS	M17	PDA
Kontrol	1	18,7×10 <sup>1</sup> kob/gr	50,0x10 <sup>2</sup> kob/g	13,0×10 <sup>6</sup> kob/gr	53,0×10 <sup>6</sup> kob/gr	76,0×10 <sup>6</sup> kob/gr	6,0x10 <sup>6</sup> kob/gr
	2	14,0×10 <sup>2</sup> kob/gr	5,0x10 <sup>2</sup> kob/ge	-	71,6×10 <sup>6</sup> kob/gr	3,0×10 <sup>5</sup> kob/gr	16,0x10 <sup>6</sup> kob/gr
STZ	1	51,0×10 <sup>2</sup> kob/gr	26,0x10 <sup>2</sup> kob/ml	3,0×10 <sup>6</sup> kob/gr	27,6×10 <sup>6</sup> kob/gr	3,0×10 <sup>7</sup> kob/gr	53,0x10 <sup>5</sup> kob/gr
	2	-	1,0x10 <sup>3</sup> kob/ml	3,0×10 <sup>6</sup> kob/gr	13,5×10 <sup>5</sup> kob/gr	1,0×10 <sup>5</sup> kob/gr	6,0x10 <sup>4</sup> kob/gr
STZ+Probiyotik	1	16,2×10 <sup>1</sup> kob/gr	47,0x10 <sup>2</sup> kob/ml	3,0×10 <sup>5</sup> kob/gr	1,0×10 <sup>6</sup> kob/gr	35,3×10 <sup>6</sup> kob/gr	83,0x10 <sup>5</sup> kob/gr
	2	16,2×10 <sup>1</sup> kob/gr	78,0x10 <sup>2</sup> kob/ml	-	24,6×10 <sup>6</sup> kob/gr	30,3×10 <sup>6</sup> kob/gr	12,6x10 <sup>4</sup> kob/gr
Probiyotik	1	47,0×10 <sup>2</sup> kob/gr	7,0x10 <sup>3</sup> kob/ml	-	30,3×10 <sup>6</sup> kob/gr	4,0×10 <sup>6</sup> kob/gr	66,0x10 <sup>7</sup> kob/gr
	2	2,0×10 <sup>2</sup> kob/gr	2,0x10 <sup>2</sup> kob/ml	2,0×10 <sup>5</sup> kob/gr	14,0×10 <sup>5</sup> kob/gr	43,0×10 <sup>6</sup> kob/gr	15,6x10 <sup>4</sup> kob/gr

**Tablo 3.11.** Probiyotik verildikten sonra 3. haftadaki bakteri sayımı (kob/gr)

Grup ismi	Gruplar	KF Streptecoccus	EMB	MRS	M17	PDA
Kontrol	1	16,7×10 <sup>1</sup> kob/gr	55,0×10 <sup>2</sup> kob/gr	5,0×10 <sup>5</sup> kob/gr	8,0×10 <sup>5</sup> kob/gr	1,0×10 <sup>5</sup> kob/gr
	2	10,0×10 <sup>2</sup> kob/gr	2,0×10 <sup>2</sup> kob/gr	71,0×10 <sup>6</sup> kob/gr	5,0×10 <sup>5</sup> kob/gr	-

**Tablo 3.11.** (Devam) Probiyotik verildikten sonra 3. haftadaki bakteri sayımı (kob/gr)

Grup ismi	Gruplar	KF Streptecoccus	EMB	MRS	M17	PDA
STZ	1	41,0×10 <sup>2</sup> kob/gr	20,0×10 <sup>2</sup> kob/gr	32,0×10 <sup>5</sup> kob/gr	1,0×10 <sup>6</sup> kob/gr	3,0×10 <sup>4</sup> kob/gr
	2	-	3,0×10 <sup>3</sup> kob/gr	12,1×10 <sup>5</sup> kob/gr	2,0×10 <sup>7</sup> kob/gr	1,0×10 <sup>4</sup> kob/gr
STZ+Probiyotik	1	14,3×10 <sup>1</sup> kob/gr	37,0×10 <sup>2</sup> kob/gr	15,0×10 <sup>6</sup> kob/gr	31,0×10 <sup>6</sup> kob/gr	6,0×10 <sup>4</sup> kob/gr
	2	15,1×10 <sup>1</sup> kob/gr	75,0×10 <sup>2</sup> kob/gr	27,0×10 <sup>4</sup> kob/gr	32,0×10 <sup>6</sup> kob/gr	8,0×10 <sup>4</sup> kob/gr
Probiyotik	1	40,0×10 <sup>2</sup> kob/gr	1×10 <sup>4</sup> kob/gr	33×10 <sup>4</sup> kob/gr	6×10 <sup>6</sup> kob/gr	1×10 <sup>5</sup> kob/gr
	2	8,0×10 <sup>2</sup> kob/gr	3×10 <sup>2</sup> kob/gr	15×10 <sup>5</sup> kob/gr	2×10 <sup>7</sup> kob/gr	12×10 <sup>4</sup> kob/gr

**Tablo 3.12.** Probiyotik verildikten sonra 4. haftadaki bakteri sayımı (kob/gr)

Grup ismi	Gruplar	KF Streptecoccus	EMB	PCA	MRS	M17	PDA
Kontrol	1	-	-	28,6×10 <sup>6</sup> kob/gr	73,0×10 <sup>8</sup> kob/gr	34,3×10 <sup>7</sup> kob/gr	-
	2	-	-	+	9,0×10 <sup>6</sup> kob/gr	33,0×10 <sup>6</sup> kob/gr	-
STZ	1	-	-	23,0×10 <sup>7</sup> kob/gr	6,0×10 <sup>7</sup> kob/gr	33,0×10 <sup>8</sup> kob/gr	16,0×10 <sup>7</sup> kob/gr
	2	-	-	16,0×10 <sup>8</sup> kob/gr	11,0×10 <sup>7</sup> kob/gr	2,0×10 <sup>9</sup> kob/gr	-
STZ+Probiyotik	1	-	-	46,0×10 <sup>8</sup> kob/gr	4,0×10 <sup>7</sup> kob/gr	1,0×10 <sup>6</sup> kob/gr	16,0×10 <sup>6</sup> kob/gr
	2	-	-	59,0×10 <sup>6</sup> kob/gr	25,0×10 <sup>7</sup> kob/gr	1,0×10 <sup>10</sup> kob/gr	6,0×10 <sup>6</sup> kob/gr
Probiyotik	1	-	-	3,0×10 <sup>7</sup> kob/gr	4,0×10 <sup>7</sup> kob/gr	1,0×10 <sup>6</sup> kob/gr	-
	2	-	-	+	11,6×10 <sup>7</sup> kob/gr	15,6×10 <sup>7</sup> kob/gr	-

**Tablo 3.13. Duodenumdan bakteri sayımı (kob/ml)**

<b>Grup ismi</b>	<b>Hayvan</b>	<b>KF Streptecoccus</b>	<b>EMB</b>	<b>PCA</b>	<b>MRS</b>	<b>M17</b>	<b>PDA</b>
Kontrol	1	-	26,6×10 <sup>3</sup> kob/ml	39,6×10 <sup>5</sup> kob/ml	11,3×10 <sup>5</sup> kob/ml	26,0×10 <sup>5</sup> kob/ml	+
	2	-	21,6×10 <sup>4</sup> kob/ml	1,0×10 <sup>7</sup> kob/ml	92,0×10 <sup>6</sup> kob/ml	+	+
	3	-	17,3×10 <sup>3</sup> kob/ml	10,3×10 <sup>4</sup> kob/ml	92,0×10 <sup>6</sup> kob/ml	15,6×10 <sup>6</sup> kob/ml	+
	4	-	13,0×10 <sup>3</sup> kob/ml	54,1×10 <sup>4</sup> kob/ml	10,8×10 <sup>5</sup> kob/ml	15,6×10 <sup>5</sup> kob/ml	+
	5	-	66,0×10 <sup>4</sup> kob/ml	98,3×10 <sup>5</sup> kob/ml	42,0×10 <sup>6</sup> kob/ml	-	+
	6	-	66,0×10 <sup>5</sup> kob/ml	34,3×10 <sup>5</sup> kob/ml	38,0×10 <sup>8</sup> kob/ml	13,6×10 <sup>6</sup> kob/ml	+
STZ	1	-	15,6×10 <sup>3</sup> kob/ml	11,4×10 <sup>5</sup> kob/ml	34,0×10 <sup>9</sup> kob/ml	12,6×10 <sup>5</sup> kob/ml	+
	2	-	3,0×10 <sup>3</sup> kob/ml	34,0×10 <sup>4</sup> kob/ml	13,0×10 <sup>7</sup> kob/ml	66,0×10 <sup>5</sup> kob/ml	+
	3	-	24,6×10 <sup>3</sup> kob/ml	+	34,0×10 <sup>7</sup> kob/ml	20,6×10 <sup>3</sup> kob/ml	+
	4	-	25,6×10 <sup>3</sup> kob/ml	17,6×10 <sup>5</sup> kob/ml	15,0×10 <sup>8</sup> kob/ml	9,0×10 <sup>6</sup> kob/ml	+
	5	-	2,0×10 <sup>3</sup> kob/ml	51,0×10 <sup>4</sup> kob/ml	55,0×10 <sup>7</sup> kob/ml	+	+
	6	-	56,0×10 <sup>4</sup> kob/ml	-	29,0×10 <sup>5</sup> kob/ml	1,0×10 <sup>4</sup> kob/ml	+
STZ+Probiyotik	1	-	3,0×10 <sup>3</sup> kob/ml	40,1×10 <sup>4</sup> kob/ml	46,0×10 <sup>7</sup> kob/ml	14,0×10 <sup>4</sup> kob/ml	+
	2	-	53,0×10 <sup>4</sup> kob/ml	-	33,0×10 <sup>9</sup> kob/ml	11,3×10 <sup>5</sup> kob/ml	+
	3	-	21,0×10 <sup>3</sup> kob/ml	1,0×10 <sup>6</sup> kob/ml	8,0×10 <sup>6</sup> kob/ml	6,0×10 <sup>4</sup> kob/ml	+
	4	-	14,3×10 <sup>3</sup> kob/ml	96,0×10 <sup>7</sup> kob/ml	8,0×10 <sup>8</sup> kob/ml	12,3×10 <sup>7</sup> kob/ml	+
	5	-	25,6×10 <sup>3</sup> kob/ml	30,3×10 <sup>5</sup> kob/ml	19,0×10 <sup>9</sup> kob/ml	+	+
	6	-	13,0×10 <sup>4</sup> kob/ml	19,6×10 <sup>4</sup> kob/ml	8,0×10 <sup>5</sup> kob/ml	1,0×10 <sup>4</sup> kob/ml	+

**Tablo 3.13.** (Devam) Duodenumdan bakteri sayımı (kob/ml)

Grup ismi	Hayvan	KF Streptecoccus	EMB	PCA	MRS	M17	PDA
Probiyotik	1	-	93,0×10 <sup>4</sup> kob/ml	42,0×10 <sup>3</sup> kob/ml	16,0×10 <sup>4</sup> kob/ml	10,3×10 <sup>4</sup> kob/ml	+
	2	-	26,0×10 <sup>3</sup> kob/ml	9,0×10 <sup>5</sup> kob/ml	9,0×10 <sup>8</sup> kob/ml	14,6×10 <sup>6</sup> kob/ml	+
	3	-	53,0×10 <sup>4</sup> kob/ml	14,3×10 <sup>3</sup> kob/ml	2,0×10 <sup>5</sup> kob/ml	33,0×10 <sup>8</sup> kob/ml	-
	4	-	63,0×10 <sup>4</sup> kob/ml	45,5×10 <sup>4</sup> kob/ml	51,0×10 <sup>7</sup> kob/ml	1,0×10 <sup>6</sup> kob/ml	+
	5	-	11,3×10 <sup>4</sup> kob/ml	+	39,0×10 <sup>4</sup> kob/ml	13,0×10 <sup>4</sup> kob/ml	-

### 3.12.4. Kan parapetreleri sonuçları

#### 3.12.4.1. Serumda insülin ölçüm sonucu

Serumda insülin ölçümü Uscn Life Sciences Insulin (Ins) Elisa kiti ile yapılmıştır (ELISA Kit for Insulin(INS) –CEA448Ra). Tablo 3.14’te insülin değerleri verilmiştir. İnsülin Kontrol grupları 172,071-939,5 (pg/ml). STZ grubunda, 43,89-466,64 (pg/ml), STZ+Probiyotik, 0-483,38 (pg/ml) değerleri arasındadır.

**Tablo 3.14.** Serumda insülin ölçümleri (pg/ml)

Gruplar	Hayvan	Insulin (INS) (pg/mL)
Kontrol	1.	939,5
	2.	195
	3.	174,76
	4.	172,071
	5.	236,83
	6.	428,984
Probiyotik	1.	221,99
	2.	114,05
	3.	256,07
	4.	466,647
	5.	284,05
STZ+Probiyotik	1.	305,64
	2.	51,99

**Tablo 3.14.** (Devam) *Serumda insulin ölçümleri (pg/ml)*

Gruplar	Hayvan	Insulin (INS) (pg/mL)	
STZ+Probiyotik	3.	483,38	
	4.	220,64	
	5.	0	
	6.	325,87	
	STZ	1.	297,54
		2.	ÇOK YÜKSEK
3.		43,89	
4.		351,51	
5.		286,75	
6.		466,64	

#### **3.12.4.2. Serumda Hemoglobin A1c (HbA1c) ölçüm sonucu**

Serumda Hemoglobin A1c ölçümü Uscn Life Sciences Insulin (HEMO) Elisa kiti ile yapılmıştır (ELISA Kit for Insulin(HEMO) –CEA190Mu). Kontrol grubu, 125-133 (ug/ml), STZ, 108-158 (ug/ml), STZ+Probiyotik, 104-155 (ug/ml) değerleri arasındadır.

**Tablo 3.15.** *HbA1c ölçüm sonucu*

Gruplar	Hayvan	Hemoglobin (Hemo) (ug/mL)
Kontrol	1.	13333,33
	2.	13166,66
	3.	12833,34
	4.	13833,34
	5.	12500
	6.	13000
Probiyotik	1.	14666,67
	2.	13499,99
	3.	15166,67
	4.	14833,32
	5.	13833,34
STZ+Probiyotik	1.	13000
	2.	14333,32
	3.	15500
	4.	10476,66
	5.	13000

**Tablo 3.15.** (Devam) *HbA1c ölçüm sonucu*

<b>Gruplar</b>	<b>Hayvan</b>	<b>hemoglobin(Hemo) (ug/mL)</b>
STZ+Probiyotik	6.	13333
STZ	1.	15666,66
	2.	14499,99
	3.	14499
	4.	13000
	5.	15833,33
	6.	10833,32

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmada kullanılan bakteri suşları Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Mikrobiyolojisi Laboratuvarından temin edilmiştir. Bu bakterilerin probiyotik karakterizasyonu için izolatların asit ve safra toleransları, antibiyotik dirençlilik, antimikrobiyal aktiviteleri, pH dirençliliği, katalaz testi, otoagregasyon ve koagregasyon, hidrofobisite ve lipaz aktiviteleri analiz edilmiştir. Bunun yanında kolesterol asimilasyonu ve glikosidaz aktivitesi test edilmiştir. Tip 1 diyabette önemli rol oynayan glikosidaz aktivitesi en yüksek olan izolat hayvan deneylerinde kullanılmıştır.

Test bakterileri kok ve basil şeklinde, Gram pozitif ve katalaz negatif özelliktedir.

Probiyotikler genellikle oral yoldan uygulandığı için, mide ve ince bağırsaktan geçişte hayatta kalma yeteneğine sahip olmalıdırlar. Bu nedenle, mide ortamındaki düşük pH'ya ve ince bağırsaktaki safra tuzuna direnç, probiyotikler için önemli özelliklerdir (Dunne et al., 2001; Gueimonde and Salminen, 2006).

Test bakterilerinin farklı pH larda gelişme durumları incelendiğinde pH 1 ve 2 de gelişmedikleri, pH 2.5 te ise MRS312, MRS312-D, MRS3111, M1724-B, M1771, M1743-A, MRS312-B ve M1743-B izolatları dışında diğer test bakterilerinin gelişmediği belirlenmiştir. pH 3-6 arasında bakterilerin büyük çoğunluğu gelişmiştir. pH 7-8 bütün test bakterilerinin geliştiği görülmüştür. Yapılan benzer çalışmalarda farklı sonuçlar verilmiştir. Bu sonuçlar Holzapfel et al.,(2001) bilinen özellikleriyle uyum sağlamaktadır. Wang ve ark (2020) bizim bulgularımız aksine probiyotik bakterilerin pH 2 de geliştiğini bildirmişlerdir. Harnandez ve ark (2016) probiyotik bakterilerin pH 2.5 canlılıklarını devam ettirdiklerini rapor etmişlerdir. Klingberget ve ark . (2005) fermente sosislerden izole edilen *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, *Pediococcus acidilactici* ve *P. Pentosaceus* için benzer bulgular bildirmişlerdir. Probiyotik bakterilerin etkinliğini gösterebilmesi için düşük pH değerlerinde canlı kalmaları gerekmektedir.

Bakterilerin asit toleransı sadece gastrik streslere dayanmak için değil, aynı zamanda diyet bileşimi olarak kullanımları için de bir ön koşuldur. Probiyotiklerin yoğurt gibi yüksek asitli gıdalarla alımında probiyotik sayısında önemli bir azalma olmadan daha uzun süre hayatta kalmasını sağlaması açısından da önem taşımaktadır (Conway vd., 1987; Prasad vd., 1998; Wang vd., 2010 ).

LAB' ların probiyotik bakteri olarak seçiminde diğer önemli kriter olan safra tuzu toleransdır. Mide asitliğinden geçebilen bakterilerin bağırsak sistemine geldikleri zaman safra tuzuna karşı direnç göstermeleri önem taşımaktadır (Dunne vd. 2001). Safra tuzlarına tolerans, konağın ince bağırsağında bakterilerin kolonizasyonu ve metabolik aktivitesi için bir ön koşul olarak kabul edilmektedir (Havenaar ve ark. 1992). Safra tuzları canlı hücreler için toksiktir ve safra tuzu toleransı, laktik asit bakterilerinin ince bağırsakta hayatta kalması için gerekli olan önemli özelliklerden biri olarak kabul edilmektedir (Succi ve ark., 2005). Safra tuzları, hücre içeriklerinde sızıntıya ve ölüme neden olan membran lipitlerini çözer (Choi ve Chang, 2015).

Gastrointestinal sistemde, safra tuzunun fizyolojik konsantrasyonu % 0,3 ile % 0,5 arasında değişmektedir (Begley ve ark., 2005). Yapılan çalışmalarda, % 0,3' lük safra konsantrasyonunun insandaki safra konsantrasyon değerine yakın olduğu için bu konsantrasyona direnç gösteren suşların önemli bir kriter olduğu bildirilmiştir (Erkkilä ve Petäjä, 2000).

Seçilen izolatların farklı konsanstrasyonlarda hazırlanan % 0,3, % 0,6, % 1,25, % 2,5 safra tuzunda optik yoğunlukları ölçülerek safra tuzlarına dirençleri belirlenmiştir . LAB izolatlarının % 0,3 ve % 0,6 konsantrasyondaki safra tuzuna karşı direnç gösterdiği ancak, safra tuzu konsantrasyonu yükseldikçe LAB'nin canlılığının düştüğü gözlenmiştir. LAB' ların safra tuzuna karşı dirençleri ile ilgili elde edilen sonuçlar, önceki yapılan çalışmalar ile paralellik göstermektedir (Shehata vd., 2016; Angmo vd., 2016). Alp ve Aslim' in (2010) yaptığı çalışmada, bifidobakterilerin % 0,3 konsantrasyonundaki safrayı % 12,35 ile % 80,66 arasında tolere edebildiklerini tespit etmişlerdir. Sabir ve arkadaşları (2010) laktobasillerin % 0,3' lük konsantrasyondaki safrayı % 72 ile % 92 arasındaki oranlarda tolere ettiklerini bildirmişlerdir. Yapılan bir çalışmada, süt ve süt ürünlerinden izole edilen 4 adet *Lactobacillus* spp. izolatları düşük pH'a toleranslı davranırken, farklı safra konsantrasyonlarında (% 0.4, 0.8, 1.0) % 80 oranında canlılıklarını ve gelişimleri sürdürdükleri bildirilmiştir (Prasad vd., 1999). Diğer bir çalışmada fermente salatalıktan izole edilen ve probiyotik özellikleri araştırılan *Pediococcus pentosaceus* CRAG3 suşunun 0.3 %'lük safra tuzuna % 73 oranında dirençlik gösterdiği bildirilmiştir (Shukla ve Goyal 2014). *Lactobacillus* spp. ve *Lactococcus* spp. ince bağırsak ve kolonlara ulaşmak ve bağırsak mikroflorasının dengelenmesine katkıda bulunmaktır (Tambekar ve Bhutada, 2010).

LAB'ların mikrobiyayı düzenlemesi için bağırsak epiteline kolonize olabilmesi gerekmektedir. Agregasyon özelliğine sahip olan LAB'lar hücrelere, buldukları yüzeylere, birbirlerine tutunarak biyolojik bir bariyer oluştururlar (Messaoudi vd., 2013; Darılmaz ve ark., 2012). Çalışmamızda koagregasyon ve otoagregasyon özellikleri incelenmiştir.

LAB'ların otoagregasyon yüzdesi % 50 üzerinde seyreden 12 izolat vardır. Bunlardan %85,36 ile D20 , %82,67 M177126 kodlu izolattır. En düşük % 7,07 ile K9LP kodlu izolattır. Guan vd., (2017) yaptıkları çalışmada fermente süttten izole edilen *L. plantarum* otoagregasyon aktivitesinin % 87,74 olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar ile örtüşmektedir.

Çalışmamızda *E. coli* ve *S. aureus* test bakterileri ile koagregasyon yeteneği araştırılmıştır. Genel olarak *E. coli* ye karşı koagregasyon yüzdesi yüksek seyretmiştir. Fakat aynı etki *S. aureus* için görülmemiştir. LAB' nın koagregasyon aktivitesinin suşa ve patojen bakteriye özgü olduğu görülmektedir.

*E. coli* test bakterisine karşı laktik asit bakterileri en yüksek % 80,91 (TM13), %73,46 (K20-1), % 69,04 (G41) koagregasyon göstermektedir. En düşük ise, % 5,73 (M621-A), % 5,79 (ÖZMRS312-A), % 6,87 (ÖZKA1) bulunmuştur. *S. aureus* için ise en yüksek % 57,36 ile LAB1.1.A kodlu izolattır. 38 izolat ise koagregasyon yapmamıştır.

Mikroorganizmaların hidrofobisite özelliği göstermesi, yüzey yapılarının kompleks olduğunu göstermektedir. Bakteri hücrelerinin yapışması ile hücre yüzey hidrofobisitesi arasında ilişki olduğu gözlemlenmiştir (Gusils vd., 2002). Çalışmamızda hidrofobisite analizi uygulanan LAB' lar genel olarak kloroform çözücüsüne karşı yüksek affinite göstermektedir. % 97,01 ile TM2 kodlu izolat en yüksek hidrofobisite göstermektedir. En düşük hidrofobisite özellik ise % 5,14 ile ÖZMRS3111-C kodlu izolat göstermektedir.

Samot vd., (2011) yapmış oldukları çalışmada LAB'ların kloroform (monopolar ve asidik) çözücüsüne karşı hidrofobisitesi incelenmiştir. %0-35 düşük, %36-70 orta ve %71-100 yüksek hidrofobisite olarak değerlendirilmiştir. Piwat vd., (2015) oral LAB'ların (*L. casei*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*) ksilen, kloroform ve etil asetata hidrofobisiteilerinin orta yüksek değerlerde olduğunu belirlenmiştir. Ji vd., (2015) tarafından yapılan çalışmada, kloroforma karşı

%90'nın üzerinde hidrofobisite olduğu bildirmiştir. Bu veriler sonuçlarımızla örtüşmektedir.

Ortam pH'sının hızlı bir şekilde düşürülmesi probiyotik bakterilerin istenilen önemli özelliklerinden birini oluşturmaktadır. Probiyotik bakteriler, çeşitli gıdalardaki laktik asit fermantasyonu sonucunda karbonhidratlardan temel metabolit olarak laktik asit üretimi yaparlar (Hwanhlem vd., 2010; Turhan vd., 2012). Laktik asit kokusuz, ekşi bir organik asit olup temel antimikrobiyel etkisini üretimi sırasında pH'daki düşüşle göstermektedir (Di Cagno vd., 2013). Bu nedenle yüksek laktik asit üretim yeteneği probiyotik bakteriler için aranan özelliklerdendir. Çalışmamızda laktik asit üretim tayini titrasyon yöntemiyle belirlenmiştir. Laktik asit üretim yüzdesi % 0,0126 ile % 0,0738 arasında bulunmuştur. Nancib (2015) 'in yaptığı bir çalışmada meyve suyuna inokule edilen *Lactobacillus rhamnosus* suşunun laktik asit üretimleri izlenmiştir. *Lactobacillus rhamnosus* suşunu yüksek laktik asit üretimi tespit edilmiştir. Bir diğer çalışmada Cui (2011) 'in yaptığı çalışmada mısır koçanından laktik asit üretimi sürecinde *Lactobacillus rhamnosus* ve *Lactobacillus brevis* karışımının kullanılmasıyla laktik asit üretiminin belirgin bir oranda arttığı tespit edilmiştir.

Antimikrobiyal aktivite patojenlerin baskılanması açısından önem taşımaktadır. Probiyotik bakteriler, antimikrobiyal metabolitlerin (laktik asit, asetik asit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bakteriyosin vb.) ve kolonize olabilecek bölgeler için patojenlerle yarışarak antimikrobiyal etki gösterirler. Bu yanında gıdaların mikrobiyolojik dengelerini koruyarak “koruyucu kültür” görevini yerine getirirler (Chih Tsai ve ark. 2016; Kaya 2013).

Altmış iki LAB izolatının antimikrobiyal aktivite test sonuçlarına göre *B. cereus*' ta sadece LAB1.1.A kodlu izolatta zon çapı görülmüştür. *C. albicans*'a karşı hiçbir LAB zon oluşturmamıştır. *K. pneumoniae* karşı MRS312 ve M1743-B kodlu izolatta 13 mm çapında zon görülmektedir. Genel olarak bu patojene karşı antimikrobiyal aktivite görülmektedir. *E. coli* patojenine karşı en yüksek LAB1.1.A, M1743-B ve M622 kodlu izolat 14 mm çapında zon gözlemlenmiştir. *S. aureus* ve *Salmonella*' ya karşı en yüksek antimikrobiyal aktivite LAB1.1.A kodlu izolat göstermektedir. D20, D21 ve M177126 bu iki patojene karşı etkisiz kalmaktadır. Laktik asit bakterileri *L. monocytogenes* patojenine karşı düşük antimikrobiyal aktivite göstermektedir. *Pseudomonas* patojenine karşı en yüksek 16 mm çapında zon oluşturan izolat ise

M1743-B kodlu laktik asit bakterisidir. TM6, TM17, D20 kodulu izolatlar *pseudomonas*'a karşı antimikrobiyal aktivite göstermemektedir.

Yapılan diğer çalışmalarda, Kaya (2013), *Lactococcus lactis* suşlarının *S. aureus* ve *B. cereus* patojenlerine karşı antimikrobiyal aktive gösterdiğini ve *Lactococcus spp.* antimikrobiyallerinin yüksek olarak bildirmiştir. Doğan ve Özpınar (2017), fermente gıdalardan izole edilen *L. brevis*, *E. faecium*, *L. paraplantarum* ve *L. plantarum* suşlarının patojen *C. albicans*, *S. aureus* ve *E.coli* patojenlerine karşı antagonistik etki gösterdikleri belirtilmiştir. Karimi vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada antimikrobiyal etkisini belirlemek için disk difüzyon ve kuyu difüzyon testleri yapılmıştır. Geleneksel süt ürünleri ve farklı sebzelerden izole edilen *Lactobacillus spp.* izolatının, 4 farklı *E. coli* patojen tipine karşı değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre her iki yöntemde de 5 probiyotik suşun *E. coli* patojen tiplerine karşı antimikrobiyal etkilerini belirtmişlerdir.

Bazı probiyotikler,  $\beta$ -galaktosidaz enzimini sentezleyebilirler ve laktozu parçalayabilmektedirler. Laktoz, vücut tarafından parçalanamasa da probiyotikler vasıtasıyla parçalayıp emilimi sağlanabilmektedir. Bundan dolayı, probiyotikler laktoz toleransını arttırmaları (Zhao vd., 2007). Yaptığımız çalışmada  $\beta$ -galaktosidaz yüzde aktivitesi % 58,23 ile % 1,43 arasında değişmektedir. Ayrıca 9 izolatta beta galaktosidaz aktivitesine rastlanmamıştır. Vinderola ve Reinheimer yaptığı çalışmada Miller'in yöntemine göre hesaplamalarında *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* suşları arasında 0 ila 2053 Miller birimi olarak bildirilmiştir. Probiyotik bakteriler için, *Lb. casei* ve *Lb. rhamnosus* için  $\beta$ -galaktosidaz eksikliği veya bu enzimin düşük değerleri tespit edilirken, bifidobakteriler için  $\beta$ -galaktosidaz aktivite değerleri 147 ila 860 Miller birimi arasında bulunmuştur. *Lb. acidophilus* suşları için en yüksek değerler (675 ila 1301 Miller birimi arasında) bildirilmiştir.

İnsanlardaki Hiperkolesterolemi (yüksek kan kolesterol seviyesi) koroner kalp hastalığının gelişimi için önemli bir risk faktörü olarak kabul edilir. Bu nedenle, hastalığı önlemek için serum kolesterol seviyesini düşürmek önem taşımaktadır (Shehata vd 2016). Probiyotiklerin, kolesterolü asimile edebilmesi önem taşımaktadır (Liong ve Shah, 2005). Yapılan çalışmalarda, probiyotiklerin ortamdaki kolesterolü düşürebilmesi için safra tuzlarına ihtiyaç duyduğu belirlenmiştir. Bakterilerin, kolesterolü kullanabilmesi için gerekli safra tuzu seviyesi ince bağırsaktakini geçmeyecek seviyede olduğu bildirilmektedir (Gilliland vd., 1985).

Çalışmamızda tüm LAB kolesterol asimilasyonu testi yapılmıştır. Kolesterol asimilasyon yüzdesi % 97,55 (M1743-A ile M1724-A) ile % 38,41 (D36) arasında değişmektedir. Diğer 16 izolatta ise kolesterol giderimi olmadığından hesaplama yapılamamıştır. Shehata vd., (2016) yaptığı çalışmada LAB suşlarını farklı kaynaklardan izole edip kolesterol asimilasyonu üzerine çalışma yapılmıştır. *Lactococcus lactis subsp. lactis* yüksek kolesterol asimile kabiliyetini en yüksek % 43.7 en düşük % 8,4 olarak bildirilmiştir. Bir diğer çalışmada, Alp ve Kuleaşan (2019), bitkilerden, fermente gıdalardan izole edilen LAB ile kolesterol giderimine bakılmıştır. En yüksek %60,71 ile % 16,71 asimilasyon olduğu bildirilmiştir. Bizim sonuçlarımız bu çalışmalara göre değerler yüksek bulunmuştur. İn vitro olarak kolesterol seviyesinde azalma yeteneği, birçok LAB suşu için çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur (Wang ve diğerleri, 2012, Miremadi ve diğerleri, 2014). Probiyotik LAB izolatları tarafından kolesterolün çıkarılmasında rol oynayan mekanizma (lar) ı belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Glukozidaz enzimleri, bağırsağın fırça kenar sınırında bulunur. Öncelikle bağırsak tarafından emilmesi için oligosakkaritlerin ve disakkaritlerin glikoza dönüştürülmesinden sorumludur (Sales vd., 2012; Kazeem vd., 2013). Diyabetli insanlarda, bozulmuş insülin sekresyonu nedeniyle glikoz homeostazı ciddi şekilde tehlikeye girer.

Çalışmamızda yüksek probiyotik özelliğe sahip 6 izolat seçilip glikosidaz aktivitesi belirlenmiştir. En yüksek inhibisyon veren MRS312 (*L. rhamnosus*) kodlu izolat olarak bulunmuştur. MRS312 30. dakika maltazı % 17,54, sükrızı % 26,74, laktazı % 29,98, amilazı % 14,43 inhibe etmiştir. Bizim deneyimizde en önemli özellik glikosidaz aktivitesinin yüksek olmasıdır. Bundan dolayı bu izolat hayvanlara verilmek üzere seçilmiştir. Panwar vd. (2013) çalışmasında *Lactobacillus* izolatlarının çoğundan elde edilen ekstraktlar, maltaz % 15-76, sükrız % 21.3-73.3, laktaz % 23.6-54.6, amilaz % 19.4-89.4 inhibisyon olduğu bildirilmiştir. *L. paracasei*, maltazı % 12-75, *L. casei* % 52 ve *L. rhamnosus* % 51'inin sükrız aktivitesini önemli ölçüde inhibe ettiği bildirilmiştir. *L. rhamnosus*, *L. casei* ve *L. paracasei* % 18-64 beta-glukozidaz (laktaz) aktivitesini önemli ölçüde inhibe ettiği bulunmuştur. *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. johnsonii*, *B. bifidum*, *L. acidophilus* ve *L. plantarum* amilazı % 6-74 oranında önemli ölçüde inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu çalışmaya göre bizim değerlerimiz biraz altta kalmaktadır. Buda kullanılan bakterilerin farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sıçanlarda haftada bir ölçülen açlık kan şekeri düzeyine baktığımızda günde iki kez  $10^{10}$  kob/ml/sıçan olacak şekilde verilen *L. rhamnosus* 312 nin açlık kan şekeri üzerine etkili olduğu saptanmıştır. Probiyotik verilmesinin STZ ile indüklenen sıçanlarda açlık kan şekerini düşürdüğü gözlenmiştir. Benzer olarak yapılan çalışmalarda da probiyotiklerin kan şekeri üzerindeki etkisi incelemiş ve bulgularımıza benzer sonuçlar elde edilmiştir (Harisa vd, 2009; Yadav vd 2006, Andersson vd, 2010). Honda vd (2012) *L. rhamnosus* GG'nin yüksek FPG'yi baskıladığını bulmuşlardır. El-Khamisy vd. (2010)  $10^8$  kob/ mL / sıçan günlük doz ile 6 haftalık bir uygulamadan sonra *L. acidophilus* ve *B. lactis*'in streptozotosin (STZ) kaynaklı diyabetin neden olduğu hiperglisemiyi önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar *B. lactis* uygulamasının hiperglisemiyi *L. acidophilus* uygulamasına göre daha fazla azalttığını bildirmişlerdir. Benzer olarak *B. lactis* ve *L. fermentum* 8 hafta boyunca  $3 \times 10^{10}$  kob / g / sıçan dozunda STZ kaynaklı diyabetin neden olduğu hiperglisemiyi önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir (Davari vd 2013).

Çalışmamızda HbA1c değerleri Tablo3.15' de verilmiştir. Her hayvan için HbA1c testi yapılmıştır. Kontrol grubu, 125-133 (ug/ml), STZ, 108-158 (ug/ml), STZ+Probiyotik, 104-155 (ug/ml) değerleri arasındadır.

STZ ile indüklenen diyabet sıçanlarda günde iki kez  $10^{10}$  kob/ml/sıçan olacak şekilde uygulanan *L. rhamnosus* 312 hiperglisemiyi önemli ölçüde düşürmüştür. Farklı bakteri türleri ile yapılan benzer çalışmalarda probiyotiklerin diyabete etkisi bakteri türlerine göre değişmekle beraber benzer bulgular sergilemiştir (Andersan vd. 2010; El-Khamisy vd., 2010; Bejar vd 2013, Alsalami vd, 2013; Davari vd. 2013). El-Khamisy vd. (2010), STZ ile indüklenen diyabette  $10^8$  kob/mL/sıçan olacak şekilde 6 hafta uygulanan probiyotiklerin ( *L. acidophilus* ve *B.lactis* ) hiperglisemiyi önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. Yine Harisa vd. (2009) 2 hafta süresince günlük  $7,56 \times 10^7$  kob/mL/sıçan olacak şekilde uygulanan probiyotığın STZ ile indüklenen diyabette hiperglisemiyi önemli ölçüde düşürdüğünü rapaor etmişlerdir. Araştırmacılar hipoglisemik etkinin *L. acidophilus* 'un gıdaların glisemik indeksini azaltması ve nitrik oksit seviyesinin düzenlenmesi ile açıklanabileceğini rapor etmişlerdir. Yadav vd (2008) probiyotiklerin sıçanlarda STZ ile indüklenen diyabeti baskıladığını bildirmişlerdir. Bunun ise nitrit oluşumunun engellenmesi ve insülin tüketiminin engellenmesi ile açıklanabileceğini rapor etmişlerdir. Ayrıca pankreatik  $\beta$ -hücrelerinin

hasardan korunması nedeniyle probiyotikler insülin seviyesini koruyarak glukoz homeostasisindeki STZ nin neden olduğu değişiklikleri geçiktirebileceğini ileri sürmüşlerdir.

Çalışmamızda her hayvan için yapılan insülin değerleri Tablo 3.14'te insülin değerleri verilmiştir. İnsülin, Kontrol grupları 172,071-939,5 (pg/ml). STZ grubunda, 43,89-466,64 (pg/ml), STZ+Probiyotik, 0-483,38 (pg/ml) değerleri arasındadır.

Günlük  $1 \times 10^{10}$  kob / sıçan olacak şekilde *L. fermentum* (Tanida vd 2014) ve  $1 \times 10^8$  kob / mL / sıçan şeklinde *L. casei* uygulamasının (Tomaro vd 2014) insülin direnci üzerine önemli bir etkisinin olmadığı bildirirken, Huang vd (2013) 8 hafta  $10^9$  kob / sıçan / gün olarak uygulanan *L. plantarum* K68 in ve benzer olarak yapılan diğer bir çalışmada Hsieh vd. (2013) 14 gün  $2 \times 10^9$  kob / sıçan / gün olacak şekilde uygulanan *L. reuteri*'nin insülin direncini etkilediğini bildirmişlerdir. Andreasen ve ark. (2010),  $10^{10}$  kob *L. acidophilus* NCFM içeren tabletleri kullandıkları 4 hafta boyunca insülin duyarlılığında önemli değişiklikler gözlemişlerdir.

Pro-enflamatuar faktörlerin (Matsuzaki vd, 1997) ve lipit konsantrasyonlarının, probiyotik uygulanmasından etkilenebileceği insülin direncini düzenlemede anahtar rol oynadığı ve bu nedenle insülin direncini düzenlemede probiyotiklerin yararlı etkileri olabileceği rapor edilmiştir ( Yadav vd 2006).

Probiyotik laktobasiller hiperglisemiye önlemede önemli bir rol oynayabilir. STZ ile indüklenen ratlarda *L. rhamnosus* 312 hiperglisemi üzerine etkisi olmuştur. Ancak bu bakterinin en etkili dozunun belirlenmesi önem taşımaktadır. Ayrıca elde edilen veriler STZ ile indüklenmiş ratlarda elde edildiği unutulmamalıdır. İnsanlardaki etkisi farklı olabilir. Dozları değişebilir. Bu nedenle insanlarda da bunların belirlenmesi gerekmektedir. Ayrıca çalışmamız diyabet olan farelerde test edildi. Diyabet oluşumu ile birlikte kullanımının nasıl bir değişim gösterecektir.

Çalışmamızda tek bir izolat denenmiştir. Karışık kültürün nasıl bir etkisin olacağını belirlenmesi de önem taşımaktadır. Çalışmamızda 4 haftalık bir probiyotik uygulanması test edilmiştir. Uzun süre kullanımının etkisinin ortaya konmalıdır.

## KAYNAKÇA

- Aarti A. Boricha, Satyamitra L. Shekh, Sheetal P. Pithva, Padma S. Ambalam, Bharatkumar Rajiv Manuel Vyas. (2019). In vitro evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* species of food and human origin. *LWT - Food Science and Technology* 106, 201–208.
- Akçelik, M., Ayhan, K., Çakır, D., Doğan, H.B., Gürgün, V., Halkman, A., Kaleli, D., Kuleaşan, H., Özkaya, D.F., Tunail, N., Tukul, C. (2000). *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Birimi, Ankara, 2. Baskı, 229-275, 514-515.
- Alp, D., Kuleaşan, H. (2019). Farklı Kaynaklardan İzole Edilmiş Laktik Asit Bakterilerinin Ekzopolisakarit Üretimi Ve Kolesterol Asimilasyon Yeteneklerinin Belirlenmesi. *The Journal Of Food*, 44(2),191-201.
- Alp, G. ve Aslim, B. (2009). Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium spp.* isolated from infants feces and breast milk. *Anaerobe*, 16(2), 101–105.
- Alphan, ME. (2013). *Hastalıklarda Beslenme Tedavisi*, (1. baskı). İstanbul: Hatipoğlu Yayıncılık, 415-508.
- American Diabetes Association (2001). Diabetes 2001 Vital statistics. Alexandria, VA: ADA.
- American Diabetes Association. (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 37 (Supplement 1), S81-S90.
- Andersson, U., Branning, C., Ahrne, S. et al. (2010). Probiotics lower plasma glucose in the high-fat fed C57bl/6j mouse. *Benef Microbes*, 1(2), 189–196.
- Andreasen, A.S., Larsen, N., Pedersen-Skovsgaard, T. et al (2010). Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. *Br J Nutr*; 104(12), 1831–1838.
- Andreasen, AS., Larsen, N., Pedersen-Skovsgaard, T., Berg, RM., Moller, K., Svendsen, KD., Jakobsen, M., Pedersen, BK. (2010). Effects of *Lactobacillus*

- acidophilus NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 104(12), 1831-8.
- Aydın, S.S. (2019). *Liyofilize Edilmiş Ve Dondurulmuş Doğal Laktik Asit Bakteri Sıvılarının, Laktik Asit Bakteri Sayısı Ve Yonca Silajı Kalitesi Üzerine Etkisi*. Doktora Tezi, Şanlıurfa: Harran Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Baba, S. (2016) *Diyabetes Mellitus Hastalarında Hipertansiyon, Hiperlipidemi, Mikrovasküler Ve Makrovasküler Komplikasyon Oranı Ve Diyabetes Mellitus Kontrolü*. Uzmanlık Tezi, Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi, İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı.
- Begley, M., Gahan, C. G., and Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews*, 29 (4), 625–651.
- Blood, A., Hayes, TM., Gamble, DR. (1975). Register of newly diagnosed diabetic children. *BMJ*, 3:580-583.
- Bosch, M., Nart, J., Audivert, S., Bonachera, M. A., Alemany, A. S., Fuentes, M. C., Cune, J. (2012). Isolation and characterization of probiotic strains for improving oral health. *Archives of Oral Biology*, 57:(5), 539–49.
- Bove, P., Russo, P., Capozzi, V., Gallone, A., Spano, G., and Fiocco, D. (2013). Lactobacillus plantarum passage through an oro-gastro-intestinal tract simulator: Carrier matrix effect and transcriptional analysis of genes associated to stress and probiosis. *Microbiological Research*, 168 (6), 351–359.
- Bozkurt, H. ve Aslım, B. (2004). İmmobilizasyonun Probiyotik Kültürlerde Kullanımı. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 2 (7), 1-14.
- Ceyhan, N. ve Alıç, H. (2012). Bağırsak mikroflorası ve probiyotikler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 5(1), 107-113.
- Chang, J., Block, T.M., Guo, J.T. (2013). Antiviral therapies targeting host ER alpha-glucosidases: current status and future directions. *Antivir Res*, 99(3),251–260

- Chih Tsai, C. ve Chou, L. C. (2016). An in vitro investigation of the antagonistic effects of multiple strains of lactobacillales on Salmonella enterica serovar choleraesuis. *Applied Microbiology: open access*, 2(1), 1–7.
- Choi, E. A., Chang, H. C. (2015). Cholesterol-lowering effects of a putative probiotic strain *L. plantarum* isolated from kimchi. *LWT - Food Science and Technology*, 62,210-217.
- Conway, L.P., Gorbach, L.S., Goldin, R.B. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.*, 70, pp. 1-12
- Cui, F., Li, Y., & Wan, C. (2011). Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*. *Bioresource technology*, 102(2), 1831-1836.
- Çakır, İ. (2003). *Lactobacillus Ve Bifidobacterlerde Bazı Probiyotik Özelliklerin İncelenmesi*. Doktora Tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Davari, S., Talaei, S.A., Alaei, H., Salami, M. (2013). Probiotics treatment improves diabetesinduced impairment of synaptic activity and cognitive function: behavioral and electrophysiological proofs for microbiome-gut-brain axis. *Neuroscience*, 240, 287–296.
- Demirbaş, M. (2019). *Tip 1 Diyabetli Hastalarda Glukoz İzleme Sistemi Memnuniyet Ölçeği' Nin Türkçeye Uyarlanması: Geçerlilik Ve Güvenirlilik Çalışması*. Tıpta Uzmanlık Tezi, İzmir: İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, İç Hastalıkları Kliniği.
- Derosa, G., Maffioli, P. (2012).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice. *Arch Med Sci*, 8(5), 899–906
- Dhanasekaran, D., Saha, S., Thajuddin, N. and Panneerselvam, A. (2008). Probiotics effect of lactobacillus isolates against bacterial pathogens in clarias orientails. *Facta Universitatis Medicine and Biology*, Vol.15, No 3, pp. 97 - 102.
- Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2013): Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*, 33(1), 1-10.

- Dogan, M. ve Ozpinar, H. (2017). Investigation of probiotic features of bacteria isolated from some food products. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 23(4), 555–562.
- Dunne, C., et al. (1999). Probiotics, from myth to reality. demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 279–292.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F., Collins, J.K. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (Suppl.), 386S–392S.
- El-Khamisy, AES. (2010). Effect of Bifidobacterium and Lactobacillus acidophilus in diabetic rats. *The 5th Arab and 2nd International Annual Scientific Conference*; Mansoura University, Egypt.
- Erkkilä, 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(3), 297–300.
- EURODIAB ACE Study Group (2000). Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe, *Lancet*, 335, 873-876.
- FAO/WHO (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Ontario, Canada, USA: Food and Agriculture Organization.
- Genç, H. (2016). *Nar Suyunda Ürün Özelliklerinin Geliştirilmesinde Probiyotik Bakterilerin Kullanımı*. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Gilliland, S.E., Nelson, C.R. ve Maxwell, C. (1985). Assimilation of Cholesterol by Lactobacillus acidophilus. *Applied And Environmental Microbiology*, 49(2), 377-381.
- Gionchetti, P., Rizzello, F., Venturi, A. and Campieri, M. (2000). Probiotics in infective diarrhoea and inflammatory bowel diseases. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 15 (5), 489-493.

- Goldin, B. R. (2011). Probiotics and health: From history to future. *Probiotics and Health Claims*, 1–16.
- Guariguata, L., Whiting, DR., Hambleton, I., Beagley, J., Linnenkamp, U., Shaw, JE. (2014). Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract*, 103(2), 137-49.
- Gueimonde, M., Salminen, S. (2006). New methods for selecting and evaluating probiotics. *Dig. Liver Dis.* 38 (Suppl. 2), S242–S247.
- Gülmez, M. ve Güven, A. (2002). Probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotik. *Kafkas üniv. Vet. Fak. Derg.*, 8 (1), 83-89.
- Gültekin, M. (2004). Probiyotikler. *Ankem Dergisi*, 18 (Ek 2), 87-89. <http://www.ankemdernege.org.tr/index.php/ankem-dergisi-yil-2004-c-18-sayi-ek2>
- Harisa G.I., Taha E.I., Khalil A.F., Salem M.M. (2009). Oral administration of *Lactobacillus acidophilus* restores nitric oxide level in diabetic rats. *Aust J Basic Appl Sci*; 3(3), 2963–2969.
- Havenaar, R., Ten Brink, B., J.H.J. Huis in't Veld. Selection of strains for Probiotic use R. Fuller (Ed.), Probiotics. *The Scientific Basis*, Chapman and Hall, London (1992), pp. 209-221.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H., Staley, J.T. ve Williams, S.T. (2000). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 527-567.
- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 365-373.
- Honda, K., Moto, M., Uchida, N., He, F., Hashizume, N. (2012). Anti-diabetic effects of lactic acid bacteria in normal and type 2 diabetic mice. *J Clin Biochem Nutr*, 51(2), 96–101.
- Hsieh, F.C., Lee, C.L., Chai, C.Y., Chen, W.T., Lu, Y.C., Wu, C.S. (2013). Oral administration of *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 improves insulin resistance and ameliorates hepatic steatosis in high fructose-fed rats. *Nutr Metab (Lond)* 10(1), 35.

- Huang, H.Y., Korivi, M., Tsai, C.H., Yang, J.H., Tsai, Y.C. (2013). Supplementation of *Lactobacillus plantarum* K68 and fruit-vegetable ferment along with high fat-fructose diet attenuates metabolic syndrome in rats with insulin resistance. *Evid Based Complement Alternat Med*, 943020.
- Hwanhlem, N., Watthanasakphuban, N., Riebroy, S., Benjakul, S., & 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.
- International Diabetes Federation. (2019). IDF Diabetes Atlas. 9th ed. Brussels: International Diabetes Federation. [http://www. diabetesatlas.org](http://www.diabetesatlas.org).
- Inzucchi, S., Bergenstal, R., Fonseca, V., Gregg, E., Mayer-Davis, B., Spollett, G., et al. (2010). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *American Diabetes Association Diabetes Care*, 33 (Supplement 1), S62-S69.
- Isolauri, E. and Am. *J. Clin. Nutr.* (2001). Probiotics: effects on immunity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Volume 73, 444–450. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.444s>
- Ji, K., Jang, N. Y., Kim Y. T. (2015). Isolation of Lactic Acid Bacteria Showing Antioxidative and Probiotic Activities from Kimchi and Infant Feces. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 25(9), 1568–77.
- Kanmani, P., Satish Kumar, R., Yuvaraj, N., Paari, Ka., Pattukumar, V., Arul, V. (2013). Probiotics and its functionally valuable products-a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53 (6), 641–58. <http://doi.org/10.1080/10408398.2011.553752>.
- Karaca, Y. (2015). *Probiyotik Özelliği Geliştirilmiş Tereyağının Depolama Süresince Kalite Kriterlerinin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Karimi, S., Rashidian, E., Birjandi, M. ve Mahmoodnia, L. (2018). Antagonistic effect of isolated probiotic bacteria from natural sources against intestinal *Escherichia coli* pathotypes. *Electronic Physician*, 10(3), 6534–6539.

- Karvonen, M., Pitkaniemi, J., Tuomilehto, J. (1999). The onset age of type 1 diabetes in Finnish children has become younger: The Finnish childhood diabetes Registry Group. *Diabetes care*, 22, 1066-1070.
- Kaya, H. İ. (2013). Tarhana izolati bazı laktik asit bakterilerinin bakteriyosinleri ve fermantasyonda patojen bakteriler üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Gıda Mühendisliği Bölümü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Pamukkale Üniversitesi
- Kazeem M.I., Dansu T.V., Adeola S.A. (2013). Inhibitory effect of *Azadirachta indica* A. Juss leaf extract on the activities of amylase and  $\alpha$ -glucosidase. *Pak J Biol Sci*, 16(21), 1358–1362
- Kim, S., Huang, E., Park, S., Holzapfel, W., and Lim, S. D. (2018). Physiological characteristics and anti-obesity effect of *Lactobacillus plantarum* K10. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 38 (3), 554.
- Kimoto, H., Ohmomo, S., Nomura, M., Kobayashi, M., and Okamoto, T. (2000). In vitro studies on probiotic properties of lactococci. *Milchwissenschaft*, 55 (5), 245–249.
- Klaenhammer, T. (2000). Probiotic bacteria: Today and tomorrow. *Journal of Nutrition*, 130, 415-416.
- Klingberg, T.D., Axelsson, L., Naterstad, K., Elsser, D., Budde, B.B., (2005). Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages. *Int.J. Food Microbiol.* 105, 419–431.
- Koll, P., Mandar, R., Marcotte, H., Leibur, E., Mikelsaar, M., Hammarstrom, L. (2008). Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health. *Oral Microbiology and Immunology*, 23, (2), 139–47.
- Laparra, J. M. and Sanz, Y. (2010). Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacological Research*, 61 (3), 219-225.
- Liong, M.T. ve Shah. N.P. (2005). Acid and Bile Tolerance and Cholesterol Removal Ability of Lactobacilli Strains. *Journal of Dairy Science*, 88, 55-66.
- Matsuzaki, T., Nagata, Y., Kado, S., et al. (1997b). Prevention of onset in an insulin-dependent diabetes mellitus model, NOD mice, by oral feeding of *Lactobacillus*

- casei. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 105, 643–649.
- Matsuzaki, T., Nagata, Y., Kado, S., Uchida, K., Hashimoto, S., Yokokura, T. (1997a). Effect of oral administration of *Lactobacillus casei* on alloxan-induced diabetes in mice. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 105, 637–642.
- Matsuzaki, T., Yamazaki, R., Hashimoto, S., Yokokura, T. (1997). Antidiabetic effects of an oral administration of *Lactobacillus casei* in a non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) model using Kk-a(Y) mice. *Endocr J*; 44(3), 357–365.
- Matsuzaki, T., Yamazaki, R., Hashimoto, S., Yokokura, T., (1997c). Antidiabetic effect of an oral administration of *Lactobacillus casei* in a non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) model using KK-Ay mice. *Endocrine Journal*, 44, 357–365.
- Mazloom, Z., Yousefinejad, A., Dabbaghmanesh, MH. (2013). Effect of probiotics on lipid profile, glycemic control, insulin action, oxidative stress, and inflammatory markers in patients with type 2 diabetes: a clinical trial. *Iran J Med Sci*, 38(1), 38-43.
- Mercenier, A., Pavan, S. and Pot, B. (2002). Probiotics as Biotherapeutic Agents: Present Knowledge and Future Prospects. *Current Pharmaceutical Design*, 8, 99-110.
- Messi, P., Bondi, M., Sabia, C., Batini, R., Manicardi, G. (2001). Detection and Preliminary Characterization of a Bacteriocin (Plantaricin 35d) Produced By a *Lactobacillus Plantarum* Strain. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 193-198.
- Miremadi, F., Ayyash, M., Sherkat, F., Stojanovska, L.. Cholesterol reduction mechanisms and fatty acid composition of cellular membranes of probiotic *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *J. Funct. Foods.*, 9 (2014), pp. 295-305.
- Mizock, B.A. (2015). Probiotics. *Disease-a-Month*, 61 (7), 259-290.

- Mohan, J. C., Arora, R., Khalilullah, M. (1990). Short term hypolipidemic effects of oral lactobacillus sporogenes therapy in patients with primary dyslipidemias. *Indian Heart Journal*, 42 (5), 361-364.
- Moroti, C., Magri, LFS., de Rezende Costa, M., Cavallini, DCU., Sivieri, K. (2012). Effect of the consumption of a new symbiotic shake on glycemia and cholesterol levels in elderly people with type 2 diabetes mellitus. *Lipids Health Dis*, 11:29.
- Muck, RE. (2010). Silage Microbiology and Its Control Through Additives. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39, 183-191.
- Nancib, A., Nancib, N., Boubendir, A., & Boudrant, J. (2015). The use of date waste for lactic acid production by a fed-batch culture using *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, (AHEAD)
- Ostadrhimi, A., Taghizadeh, A., Mobasser, M., Farrin, N., Payahoo, L., Beyramalipoor Gheshlaghi, Z., Vahedjabbari, M. (2015). Effect of probiotic fermented milk (kefir) on glycemic control and lipid profile in type 2 diabetic patients: a randomized double-blind placebo controlled clinical trial. *Iran J Public Health*, 44(2), 228-37.
- Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Grünland, M.M., Isolavri, E. and Salminen, S.J. (1999). Adhesion of probiotic microorganisms to intestinal mucus. *International Dairy Journal*, 9, 623-630.
- Ozougwu, JC, Obimba KC, Belonwu CD, Unakalamba CB. (2013). The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J. Physiol. Pathophysiol*, 4.(4), 46-57.
- Özden, A. (2006). Gastro-intestinal Sistem ve Probiyotik-Prebiyotik Synbiyotik. *Güncel Gastroenteroloji*, 10/3, 273-278.
- Özen, M. (2011). *Sağlıklı Kalmak İçin Anlatılmayan Tarihçe; Probiyotikler Ve Prebiyotikler*. Nobel tıp kitap evleri, 1-15
- Özer, D., Akın, M.S. (2000). Probiyotik Fermente Süt Ürünleri Ve Prebiyotikler. *VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı*, s273-278. Tekirdağ.

- Pan, D. D., Zeng, X. Q. and Yan, Y. T. (2011). Characterisation of *Lactobacillus fermentum* SM- 7 isolated from koumiss, a potential probiotic bacterium with cholesterol- lowering effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(3), 512-518.
- Panwar, H., Calderwood, D., Grant, I.R., Grover, S., Green, B.D. (2014). *Lactobacillus* strains isolated from infant faeces possess potent inhibitory activity against intestinal alpha- and beta-glucosidases suggesting anti-diabetic potential. *Eur J Nutr*, 53, 1465-1474.
- Pithva, S., Shekh, S., Dave, J., and Vyas, B. R. M. (2014). Probiotic attributes of autochthonous *Lactobacillus rhamnosus* strains of human origin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173 (1), 259–277.
- Piwat, S., Sophatha, B., Teanpaisan, R. (2015). An assessment of adhesion, aggregation and surface charges of *Lactobacillus* strains derived from the human oral cavity. *Letters in Applied Microbiology*, 61, 98-105.
- Prasad, J., Gill, H., Smart, J. ve Gopal, P. K. (1999). Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *International Dairy Journal*, 8(12), 993–1002.
- Prasad, J., Gill, H., Smart, J., Gopal, P.K. (1998). Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *Int. Dairy J.*, 8, pp. 993-1002
- Psoni, L., Kotzamanides, C., Andrighetto, C., Lombardi, A., Tzanetakis, N. ve Litopoulou-Tzanetaki, E. (2006). Genotypic and phenotypic heterogeneity in *Enterococcus* isolates from Batzos, a raw goat milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 109(1–2), 109–120.
- Sabir, F., Beyatli, Y., Cokmus, C., & Onal-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.

- Sales P.M., Souza P.M., Simeoni L.A., Magalhaes P.O., Silveira D. (2012).  $\alpha$ -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *J Pharm Pharm Sci*, 15(1), 141–183
- Salminen, K., Rautelin H., Tynkkynen, S., Poussa, T., Saxelin, M., Valtonen, V., (2004). Lactobacillus Bacteremi, Clinical Significance and Patient Outcome with Special Focus on Probiotic L. Rhamnosus GG, Tampere, Finland
- Salminen, S. (1998). Probiotics: Scientific support for use. *Food Technology*, 53(11), 66.
- Salminen, S. (1999). Probiotics: Scientific support for use. *Food Technol*, 53, 66.
- Salminen, S., VonWright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W.M., Fondén, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E. and Mattila-Sandholm, T. (1998). Demonstration of safety of probiotic a review. *Int. J. Food Microbiol.* 44, 93–106.
- Samot, J., Lebreton, J., Badet, C. (2011). Adherence capacities of oral lactobacilli for potential probiotic purposes. *Clinical Microbiology*, 17, 69-72.
- Sarao, L.K. and Arora, M. (2017). Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57 (2), 344-371
- Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T., and de Vos, W. M. (2005). Probiotic and other functional microbes: From markets to mechanisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 16 (2), 204–211.
- Shehata, M.G., El Sohaimy, S.A., El-Sahn, M.A., Youssef, M.M. (2016). Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *Annals of Agricultural Science*, 61(1), 65-75.
- Shukla, R. ve Goyal, A. (2014). Probiotic Potential of *Pediococcus pentosaceus* CRAG3: a new isolate from fermented cucumber. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 6(1), 11–21.

- Sinkiewicz, G. (2010). *Lactobacillus reuteri in health and disease*. Doctora Tezi, Malmo University Faculty of Health and Society Department of Biomedical Laboratory Sciences, Holmbergs, Malmo.
- Sirilun, S., Chaiyasut, C., Kantachote, D., & Luxananil, P. (2010). Characterisation of non human origin probiotic *Lactobacillus plantarum* with cholesterol-lowering property. *African Journal of Microbiology Research*, 4(10), 994-1000.
- Soccol, C. R., Vandenberghe, S. L. P., Spier, M. R., Medeiros, A. B. P., Yamaguishi, C. T., Lindner, J. D., Pandey, A. and Soccol, V. T. (2010). *Food Technol. Biotechnol*, 48 (4), 413–434.
- Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Sorrentino, E., Grazia, L. Pacifico, S. (2005). Bilesalt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *FEMS Microbiology Letters*, 244(1), 129-137.
- Swagerty, D. L., Walling, A. D. and Klein, R. M. (2002). Lactose intolerance. *American family physician*, 65 (9), 1845-1860.
- Tabuchi, M., Ozaki, M., Tamura, A., et al. (2003). Antidiabetic effect of *Lactobacillus* GG in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 67, 1421–1424.
- Tabuchi, M., Ozaki, M., Tamura, A., Yamada, N., Ishida, T., Hosoda, M., Hosono, A. (2003). Antidiabetic effect of *Lactobacillus* GG in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67(6), 1421-1424.
- Taheur, B. F., Kouidhi, B., Fdhila, K., Elabed, H., Ben Slama, R., Mahdouani, K., Bakhrouf, A., Chaieb, K. (2016). Anti-bacterial and anti-biofilm activity of probiotic bacteria against oral pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 97, 213–220.
- Tambekar, D.H., Bhutada, S.A. (2010). Studies on antimicrobial activity and characteristics of bacteriocins produced by *Lactobacillus* strains isolated from milk of domestic animals. *Internet J. Microbiol.*, 8, pp. 1-6.
- Tamer, A.U., Ucar, F., Unver, E., Karaboz, D., Bursahoglu, M., Ogultekin, R. (1989). 3. ve 4. Sınıf Mikrobiyoloji Laboratuvar Klavuzu, Anadolu Universitesi, Eğitim

Sağlık ve Bilimsel Araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınları, No. 74, Eskişehir, 23-25, 240.

- Tanida, M., Imanishi, K., Akashi, H. et al. (2014). Injection of *Lactobacillus casei* strain shirota affects autonomic nerve activities in a tissue-specific manner, and regulates glucose and lipid metabolism in rats. *J Diabetes Investig*, 5(2): 153–161.
- Tok, E. ve Aslım, B. (2007). Probiyotik olarak kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin kolesterol asimilasyonu ve safra tuzları dekonjugasyonundaki rolleri. *Türk Mikrobiyol Cem Dergisi*. 37 (1) : 62-68.
- Tomaro-Duchesneau, C., Saha, S., Malhotra, M., et al. (2014). Effect of orally administered *L. Fermentum* NCIMB 5221 on markers of metabolic syndrome: an in vivo analysis using ZDF rats. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98(1): 115–126.
- Tonucci, LB., Olbrich Dos Santos, KM., Licursi de Oliveira, L., Rocha Ribeiro, SM., Duarte Martino, HS. (2017). Clinical application of probiotics in type 2 diabetes mellitus: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Clin Nutr*, 36(1) 85-92.
- Turhan, İ. (2012). Kaşar peyniri üretimi için Starter kültür izolasyonu ve izolatların FTIR spektroskopisi ile tanısının yapılması. Doctoral dissertation, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.,
- Ural, B. (2018). *Diyabetlilerde Tatlandırıcı Ve Diyet/Diyabetik Ürün Kullanım Durumu*. Yüksek lisans tezi, İstanbul: Okan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Vinderola, C.G., Reinheimer, J.A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36; 895-904.
- Vinderola, C.G., Reinheimer, J.A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and viological barrier resistance. *Food Research International*, 36, 895-904.

- Waldron-Lynch, F. and Herold, KC. (2009). Advances in Type 1 diabetes therapeutics: immunomodulation and beta-cell salvage. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 38(2): 303-17.
- Wang, C. Y., Lin, P. R., Ng, C. C., & Shyu, Y. T. (2010). Probiotic properties of Lactobacillus strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe*, 16, 578-585.
- Wang, J., Zhang, H., Chen, X., Chen, Y., Menghebilige, B.Q. (2012). Selection of potential probiotic lactobacilli for cholesterol-lowering properties and their effect on cholesterol metabolism in rats fed a high-lipid diet. *J. Dairy Sci.*, 95, pp. 1645-1654.
- Yadav, H., Jain, S., Sinha, P.R. (2006). Effect of Skim Milk and Dahi (Yogurt) on Blood Glucose, Insulin, and Lipid Profile in Rats Fed with High Fructose Diet. *J Med Food*, 9(3): 328–335.
- Yadav, R., Dey, D. K., Vij, R., Meena, S., Kapila, R., and Kapila, S. (2018). Evaluation of antidiabetic attributes of Lactobacillus rhamnosus MTCC: 5957, Lactobacillus rhamnosus MTCC: 5897 and Lactobacillus fermentum MTCC: 5898 in streptozotocin induced diabetic rats. *Microbial Pathogenesis*, 125, 454–462.
- Yun, S.I., Park, H.O., Kang, J.H. (2009). Effect of Lactobacillus gasseri BNR17 on blood glucose levels and body weight in a model of type 2 diabetes. *Journal of Applied Microbiology*, 107,1681-1686.
- Yun, SI., Park, HO., Kang, JH. (2009). Effect of Lactobacillus gasseri BNR17 on blood glucose levels and body weight in a mouse model of type 2 diabetes. *J Appl Microbiol*, 107(5):1681-86.
- Zhao, R., Sun, J. ve Mo, H. (2007). Analysis of functional properties of Lactobacillus acidophilus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 195-200.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Aslı MERCAN

Yabancı Dil : İngilizce

Doğum Yeri ve Yılı : Bakırköy / 1992

E-Posta : aslimercaan@hotmail.com

### Eğitim:

- 2011, Tekirdağ Lisesi, Fen Bölümü
- 2016, Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoloji Anabilim Dalı
- 2020, Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalı

### Yayınlar:

- Mercan, A., Kıvanç, M. (2018). Determination of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Produced in Cheese. *Eurasian Natural Nutrition and Healthy Life*, 365-366, (Sözlü-Özet bildiri).
- Mercan. A., Kıvanç, M. (2019). Laktik Asit Bakterilerinin Kolesterol Asimilasyonu. *2nd International Health Science and Life Congress*, (Poster Sunumu).

### Burslar:

- TÜBİTAK, 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı