



T.C.

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI**

**KEFİRDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN
PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN VE BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HÜMEYRA BODUR

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi CEREN BAŞKAN

(İkinci danışman: Dr. Öğr. Üyesi MERVE YURTTAŞ)

AMASYA

OCAK 2023

T.C.
AMASYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

KEFİRDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN
PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN VE BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Hümeysra BODUR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Ceren BAŞKAN
(İkinci danışman: Dr. Öğr. Üyesi Merve YURTTAŞ)

AMASYA

OCAK 2023

HÜMEYRA BODUR tarafından hazırlanan “**KEFİRDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN VE BİYOLOJİK AKTİVELERİNİN BELİRLENMESİ**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Amasya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Tıp** Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ceren BAŞKAN

Moleküler Tıp Anabilim Dalı, AMASYA Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Başkan: Doç. Dr. Önder İDİL

Moleküler Tıp Anabilim Dalı, AMASYA Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Umut AYKUT

Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ondokuzmayıs Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Tez Savunma Tarihi:26/ 01/2023

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Prof. Dr. Prof. Dr. Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü V.

ETİK BEYAN

Amasya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Hümeyra BODUR

26/01/2023

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim hayatım süresince desteklerini hiç esirgemeyen bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli danışman hocam Dr. Öğretim Üyesi Ceren Başkan ve Dr. Öğretim Üyesi Merve Yurttaş'a,

Laboratuvar çalışmalarında sekans analiz sonuçlarında yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Emine Çelikoğlu hocama, Sitotoksik aktivite deneylerinde yardımcı olan Öğr. Gör Aybüke Afra Keskiner hocama,

FMB-BAP 21-0500 Proje No'lu tez projesinin yürütülmesindeki desteklerinden ötürü Amasya Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi'ne,

Hayatımın her alanında yanımda olan sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

Hümeysra BODUR

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLolar DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
RESİMLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÖZET	ix
ABSTRACT.....	x
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Probiyotiklerin Tanımı, Tarihçesi ve Önemi	3
2.1.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların genel özellikleri	4
2.1.2. Probiyotik olarak kullanılan bakteriler	5
2.1.3. Probiyotiklerin etki mekanizmaları	5
2.1.3.1. Bakteriyosin üretimi	6
2.1.3.2. Asitlik ve safra tuzlarına direnç	8
2.1.3.3. Bağırsak hücrelerine tutunma ve kolonizasyon	9
2.1.4. Probiyotik olarak kullanılan gıdalar	9
2.2.Kefir	9
2.2.1.Kefirin tanımı	9
2.2.2.Kefirin tarihçesi	9
2.2.3. Kefir daneleri.....	10
2.2.4.Kefirin besin değeri ve bileşimi	11
2.2.5.Kefir üretimi	12
2.2.5.1.Geleneksel kefir üretimi	12
2.2.5.2. Endüstriyel kefir üretimi.....	13
2.2.6.Kefirin sağlık üzerine etkileri.....	14
2.2.6.1. Kefirin mikrobiyota üzerine etkileri	15
2.2.6.2. Kefirin laktoz intoleransına etkisi.....	16
2.2.6.3.Kefirin antimikrobiyal etkisi.....	16
2.2.6.4. Kefirin obezite ve diyabet üzerine etkisi	17
2.2.6.5. Kefirin kanser üzerine etkisi	18
2.3. Kanser	19
2.3.1. Kolorektal kanser	20

3. MATERYAL METOD.....	23
3.1. Materyal	23
3.1.1. Kefir örneklerinin temini	23
3.1.2. Tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasallar	23
3.1.3. Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar	24
3.1.4. Besiyeri ve çözeltilerin hazırlanışı	24
3.1.4.1. De Man Rogosa ve Sharpe agar.....	24
3.1.4.2. De Man Rogosa ve Sharpe broth	24
3.1.4.3. M17 broth	24
3.1.4.4. Mueller Hinton agar.....	24
3.1.4.5. Fizyolojik tuzlu su	25
3.1.4.6. Tris-Borik asit- EDTA tamponu (TBE, 10X).....	25
3.2. Fizikokimyasal Analizler	25
3.2.1. pH değeri	25
3.2.2. Toplam asitlik.....	25
3.2.3. Kuru madde miktarı.....	26
3.2.4. Kül miktarı	26
3.2.5. İstatistik analizi.....	26
3.3. Bakterilerin İzolasyonu	27
3.3.1. Laktik asit bakterilerinin saflaştırılması ve muhafazası	27
3.4. Laktik Asit Bakterilerinin Fenotipik Olarak Tanımlanması	27
3.4.1. Katalaz testi	27
3.4.2. Gram boyama	28
3.5. Kefir Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Özellikleri	28
3.5.1. Laktik asit bakterilerinin farklı sıcaklıklarda gelişimi	28
3.5.2. Laktik asit bakterilerinin farklı tuz konsantrasyonlarında gelişimi.....	28
3.5.3. Laktik asit bakterilerinin farklı pH derecelerinde gelişimi	28
3.5.4. Laktik asit bakterilerinde hidrojen sülfür oluşumu	29
3.5.5. Laktik asit bakterilerinin antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi	29
3.5.6. Bakteriyosin üretiminin ve antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi	29
3.5.7. Otoagregasyon testi	30
3.6. Laktik Asit Bakterilerinin Genotipik Olarak Tanımlanması.....	30
3.6.1. DNA izolasyonu ve miktar tayini.....	30
3.6.2. DNA amplifikasyonu	31
3.7. Dizi Analizi	32

3.8. Laktik Asit Bakterilerinden Üretilen Ekzopolisakkaritlerin Sitotoksik Aktivitesinin Belirlenmesi.....	33
3.8.1. Ekzopolisakkarit izolasyonu.....	33
3.8.2. Hücre kültürü ve kültür şartlarının hazırlanması.....	33
3.8.3. Hücre sitotoksosite testi	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. Fizikokimyasal Özellikler	34
4.2. Laktik Asit Bakterilerinin Saflaştırılması ve Muhafazası.....	35
4.3. Kefir Örneklerinin Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi	37
4.3.1. Laktik asit bakterilerinin farklı sıcaklıklarda gelişim.....	37
4.3.2. Laktik asit bakterilerinin farklı tuz konsantrasyonlarında gelişim	38
4.3.3. Laktik asit bakterilerinin farklı pH derecelerinde gelişimi	38
4.3.4. Laktik asit bakterilerinin TSI agarda gelişimleri.....	38
4.5. Bakteriyosin Üretiminin Belirlenmesi ve Antibakteriyel Aktivite Testleri	41
4.6. Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi.....	42
4.7. Otoagregasyon Testi	43
4.8. Sekans Sonuçları	43
4.9. Ekzopolisakkarit Üretimi ve Sitotoksosite Testleri	44
5. TARTIŞMA.....	46
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	50
KAYNAKLAR	52
EKLER	64
ÖZGEÇMİŞ	67

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar	5
Tablo 2.2. Kefirin içeriği.....	12
Tablo 2.3. Kefirin Bileşimi	12
Tablo 3.1. PZR çalışmasında kullanılmış olan primer dizileri.....	30
Tablo 3.2. PZR reaksiyon bileşenleri.....	31
Tablo 3.3. PZR reaksiyon koşulları	31
Tablo 4.1. Kefir örneklerinin fizikokimyasal analiz sonuçları.....	34
Tablo 4.2. Laktik asit bakterilerinin mikrobiyolojik özellikleri.....	39
Tablo 4.3. Laktik asit bakterilerinin antibiyotik duyarlılık sonuçları	43
Tablo 4.4. Sekans sonucunda gen bankası ile ilişkili yakın türler	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kefir tanelerinin makroskopik yapısı	10
Şekil 2.2. Geleneksel kefir üretimi	13
Şekil 2.3. Endüstriyel kefir üretimi	14
Şekil 2.4. 2020 yılına ait kanser vaka oranları	20
Şekil 2.5. Kolonun anatomik bölümleri	21
Şekil 2.6. Kalın bağırsakta polip ve kanser oluşumu	21
Şekil 4.1. L. mesenteroides'den elde edilen ekzopolisakkaritin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.....	45



RESİMLER DİZİNİ

Resim 3.1. Kullanılan DNA laddera ait fragment profili, PZR ve jel elektroforezi ..	32
Resim 4.1. Laktik asit bakterileri kolonileri	35
Resim 4.2. Katalaz testi.....	36
Resim 4.3. Gram boyama sonucunda Gram pozitif izolatların morfolojileri.....	36
Resim 4.4. Laktik asit bakterilerinin jel elektroforez görüntüsü	37
Resim 4.5. Laktik asit bakterilerinin TSI agarda gelişimi.....	38
Resim 4.6. Bakteriyosin pozitif izolatlar.....	41
Resim 4.7. Laktik asit bakterilerinin antibiyotik duyarlılık sonuçları.....	42
Resim 4.8. DLD-1 kolon karsinoma hattı	45

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Bu tez kapsamında kullanılan simgeler ve kısaltmalar aşağıda belirtilmiştir.

Simgeler

°C

dH₂O

g

H₂O₂

H₂S

kg

L

mm

mL

mM

NaCl

rpm

U

µg

µL

Açıklamalar

Santigrat derece

Distile su

Gram

Hidrojen peroksit

Hidrojen sülfür

Kilogram

Litre

Milimetre

Mililitre

Milimolar

Sodyum klorür

Revolution per minute

Unit

Mikrogram

Mikrolitre

Kısaltmalar

ATCC

BHI

DMSO

DSÖ

EDTA

IC₅₀

MHA

MTT

Açıklamalar

Amerikan kültür koleksiyonu

Brain heart infusion broth

Dimetil sülfoksit

Dünya Sağlık Örgütü

Etilendiamintetra asetikasit

%50 olan inhibitör konsantrasyonu

Mueller Hinton agar

(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-
2,5 diphenyltetrazolium bromide)

MRS	De Man Rogosa ve Sharpe
TBE	Trizma base, Borik asit, EDTA
TSA	Triptik soy agar
TSI	Triple Sugar Iron



ÖZET

KEFİRDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN VE BİYOLOJİK AKTİVELERİNİN BELİRLENMESİ

Hümeysra Bodur

Amasya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Yüksek Lisans, Aralık/2022
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ceren Başkan
Dr. Öğr. Üyesi Merve Yurttaş

Probiyotik mikroorganizmalar hastalıkları önlemek ve tedavi etmek amacıyla yıllardır kullanılmaktadır. Özellikle bu mikroorganizmaların ürettikleri bakteriyosinler ve ekzopolisakkaritlerin mikrobiyotada önemli yeri bulunmaktadır. Fermente bir süt ürünü olan kefir probiyotik mikroorganizma açısından zengin olması sebebiyle giderek artan bir ürün haline gelmiştir. Bu sebeple çalışmada, kefirde izole edilen laktik asit bakterilerinin probiyotik özelliklerinin ve biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 12 ticari, 3 ev yapımı olmak üzere toplam 15 adet kefir örneği toplanmıştır. Öncelikle kefir örnekleri pH, toplam asitlik, kuru madde ve kül analizleri gibi fizikokimyasal parametreler açısından analiz edilmiştir. pH, kuru madde ve kül analizleri bakımından elde edilen sonuçlar ise literatür ile uyumlu olmakla birlikte bu sonuçların kefir üretim parametreleri ve kullanılan hammaddeye göre değişebildiği görülmüştür. Fizikokimyasal parametrelerin ardından örneklerden konvansiyonel yöntemlerle elde edilen laktik asit bakterilerini tür düzeyinde doğrulamak için fenotipik testler uygulanmıştır. Fenotipik testler sonucunda 142 izolat şüpheli laktik asit bakterisi olarak belirlenmiştir. Belirlenen şüpheli izolatların 16S rRNA PZR analizi ile genotipik olarak tanımlanmış ve 37 izolatın 1500 bp bölgesinde bant verdiği gözlemlenmiştir. Fenotipik ve genotipik testler yapılan bakterilerden bakteriyosin elde edilmiş ve dört Gram pozitif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 7064, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Streptococcus mutans* ATCC35668) dört Gram negatif (*Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Salmonella enteridis* ATCC13076) bakteri üzerindeki antimikrobiyal etkileri kuyu difüzyon yöntemiyle tespit edilmiştir. Kuyu difüzyon sonucuna göre 3 izolatın *S. mutans* üzerinde bakteriyosin özelliği pozitif olarak belirlenmiştir. Bakteriyosin pozitif olan izolatların 16S rRNA sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. Dizileme sonucu elde edilen okumaların kalitesi BioEdit programı ile birleştirilmiş ve NCBI Nucleotide BLAST programı kullanılarak Gen bankasında en yakın ilişkili tür belirlenmiştir. Sekans analizi sonucunda 1 izolat *Leuconostoc mesenteroides* olarak belirlenmiştir. Fenotipik ve genotipik olarak doğrulanan laktik asit bakterisinden ekzopolisakkarit elde edilmiş DLD-1 (insan kolon adenokarsinomu) ve CCD-18Co (normal kolon) hücre hatları üzerindeki 24, 48 ve 72 saatteki sitotoksik aktivitesi MTT yöntemi ile analiz edilmiştir. MTT testi sonucunda ekzopolisakkaritin DLD-1 hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktivitesi 24 saat için IC₅₀ değeri 2500 µg/mL olarak belirlenmiş, CCD-18Co hücre hattı üzerinde ise herhangi bir sitotoksik aktivite göstermediği tespit edilmiştir. Bu durum ekzopolisakkaritin sağlıklı kolon hücrelerine zarar vermeden kolon kanser hücresi üzerinde seçici toksik etki oluşturacağını göstermektedir. Yapılan bu çalışma ile kefirin mikrobiyota üzerindeki olumlu etkisi bir kez daha vurgulanmıştır.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyal aktivite, kefir, kolon kanseri, laktik asit bakterisi, 16S rRNA

ABSTRACT

DETERMINATION OF PROBIOTIC PROPERTIES AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM KEFIR

Hümeýra Bodur

Amasya University, Institute of Health Sciences
Department of Molecular Medicine, MSc, December/2022
Supervisor: Assist. Prof. Ceren Başkan
Co- Supervisor: Assist. Prof. Merve Yurttas

Probiotic microorganisms have been used for years to prevent and treat diseases. Especially the bacteriocins and exopolysaccharides produced by these microorganisms have an important place in the microbiota. Kefir, which is a fermented milk product, has become an increasing product due to its richness in probiotic microorganisms. For this reason, in this study, it was aimed to determine the probiotic properties and biological activities of lactic acid bacteria isolated from kefir. For this purpose, a total of 15 kefir samples, 12 commercial and 3 homemade, were collected. Firstly, kefir samples were analyzed in terms of physicochemical parameters such as pH, total acidity, dry matter and ash analysis. Although the results obtained in terms of pH, dry matter and ash analyzes are compatible with the literature, it has been observed that these results may vary according to the kefir production parameters and the raw material used. Phenotypic tests were applied to confirm the lactic acid bacteria obtained from the samples by conventional methods at the species level. As a result of phenotypic tests, 142 isolates were determined as suspicious lactic acid bacteria. The suspected isolates were identified genotypically by 16S rRNA PCR analysis and it was observed that 37 isolates gave bands in 1500 bp region. Afterwards, bacteriocin was obtained from the bacteria for which phenotypic and genotypic tests were performed, and its antimicrobial effects on four Gram positive and four Gram negative bacteria were determined by the well diffusion method. According to the well diffusion results, 3 isolates were positive for bacteriocin on *S. mutans*. 16S rRNA sequence analyzes of bacteriocin positive isolates were performed. The quality of the reads obtained as a result of sequencing was combined with the BioEdit program and the most closely related species was determined in the Genbank using the NCBI Nucleotide BLAST program. As a result of the sequence analysis, 1 isolate was determined as *Leuconostoc mesenteroides*. The cytotoxic activity at 24, 48 and 72 hours on DLD-1 (human colon adenocarcinoma) and CCD-18Co (normal colon) cell lines obtained from exopolysaccharide obtained from phenotypically and genotypically confirmed lactic acid bacteria was analyzed by MTT method. As a result of the MTT test, the cytotoxic activity of exopolysaccharin on the DLD-1 cell line was determined as 2500 µg/mL for 24 hours, and it was determined that it did not show any cytotoxic activity on the CCD-18Co cell line. This shows that exopolysaccharin will have a selective toxic effect on colon cancer cells without harming healthy colon cells. With this study, the positive effect of kefir on the microbiota was emphasized once again.

Keywords: Antimicrobial activity, kefir, colon cancer cell line, lactic acid bacteria, 16S rRNA

1.GİRİŞ

Uluslararası ve ulusal literatüre göre beslenme; yaşamın sağlıklı bir şekilde korunup devam ettirilmesi için vücudun ihtiyaç duyduğu besin öğelerinin vücuda alınması ve kullanılmasıdır [1]. Son yıllarda yaşam koşullarının değişmesi ile beslenme alışkanlıklarında da değişimler olmuş, geleneksel beslenme tarzı yerini çabuk hazırlanabilen, birçok katkı maddesinin kullanıldığı, uzun raf ömrüne sahip gıdalara bırakmıştır. Tüm Dünya’da yapılan bilimsel çalışmalarda özellikle obezite, diyabet, kolesterol, kardiyovasküler hastalıklar ve kanserin artış gösterdiği ve bu hastalıkların beslenme ile ilişkilendirildiği görülmektedir [2, 3, 4]. Bu gelişmelerle birlikte insanlar besin seçiminde doğal ve sağlık üzerine olumlu etkileri olan fonksiyonel gıdalara yönelmiştir. Kefir probiyotik özelliğe sahip gıdalarda önemli fonksiyonel gıdalardan biridir.

Probiyotikler; vücuda dengeli olarak alındığında sağlık üzerinde faydaları olan ürünlerdir [5]. Probiyotiklerin gastrointestinal florayı düzenleme, immün sistemi destekleme, inflamatuvar bağırsak ve çocukluk çağı hastalıklarının önlenmesi gibi etkileri bulunmaktadır [6]. Probiyotikler besinlerle alınabildiği gibi tablet veya kapsül şeklinde de tüketilebilmektedir. Probiyotikler terapötik etki gösterebilmesi için her gün düzenli kullanımı ve canlı hücre konsantrasyonu en az 10^6 kob/ml olacak şekilde vücuda alınması tavsiye edilir. Probiyotik olarak en fazla tüketilen grup; fermente süt ve süt ürünleridir. [7, 8, 9]. Kefir probiyotik olarak tüketilen en yaygın fermente süt ürünlerinden biridir. Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği’ne göre kefir; fermantasyonda spesifik olarak *Lactobacillus kefiri*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* ve *Acetobacter* cinslerinin değişik suşları ile laktozu fermente eden (*Kluyveromyces marxianus*) ve fermente etmeyen mayaları (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces exiguus*) içeren starter kültürler ya da kefir tanelerinin kullanıldığı fermente süt ürünü olarak tanımlanmaktadır [10].

Kefir, Kafkasya bölgesinde bölge halkının serinlemek amacıyla inek ve keçi sütü kullanarak ürettikleri geleneksel bir içecektir. Türkçede keyif anlamına gelen “Keyf” kelimesinden türeyen kefirin; kephir, knapan, kiaphur gibi farklı isimlerle kullanılmaktadır [11]. Vitamin ve mineraller bakımından zengin olan kefir, sütün bileşiminde bulunan temel besin öğelerinin büyük bir kısmını içermektedir. Ayrıca fermantasyonla birlikte süt

içerisinde bulunan laktoz ve proteinler kısmen parçalanmakta ve çeşitli biyoaktif bileşikler meydana gelmektedir. Bunun sonucunda besin değeri artmış, sağlık açısından önemli faydaları bulunan, kolay sindirilebilir, laktoz intoleransını düşüren bir ürün ortaya çıkmaktadır [12].

Bu bilgiler ışığı altında bu tez çalışmasında

- Sağlığı geliştirici, hastalıkları önleyici ve fonksiyonel bir besin olarak kullanılan, ev yapımı ve ticari kefirlerden izole edilen laktik asit bakterilerinin fenotipik ve genotipik olarak tanımlanması
- Fenotipik ve genotipik olarak doğrulanan bakterilerin bazı teknolojik ve probiyotik özelliklerinin belirlenerek bu bakterilerden bakteriyosin üreten ve antimikrobiyal aktiviteye sahip türlerin belirlenmesi
- Antimikrobiyal aktiviteye sahip türlerden de ekzopolisakkarit üretilerek insan kolon kanseri üzerinde sitotoksik aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Probiyotiklerin Tanımı, Tarihçesi ve Önemi

Günümüzde probiyotik ve prebiyotik gibi fonksiyonel ürünlere olan talep giderek artmaktadır [12]. Fonksiyonel gıda bileşeni olarak bilinen Probiyotik terimi, “Pro” ve “biota” latince kelimelerinden türemiş olup “canlı için” anlamına gelmektedir. Probiyotik mikroorganizmalar yeterli miktarda alındığında kalitatif veya kantitatif olarak mikrobiyotayı etkileyen özellikle intestinal sistemin mikrobiyal dengesini düzenleyen ve bağışıklık sistemini güçlendirerek konakçı için yararlı etkiler gösteren canlı mikroorganizmalardır [13-16].

Probiyotiklerin varlığı ilk olarak Rus araştırmacı Elie Metchnikoff'un 20. yy'nin başlarında yaptığı çalışmalarla ortaya konulmuştur. Metchnikoff, Bulgar köylülerinin daha uzun yaşadığını fark etmiş ve bu durumu incelediğinde ise bu insanların yoğurt tüketiminin fazla olduğunu tespit etmiş, sonrasında yoğurdu inceleyerek birçok canlı bakteri ile karşılaşmıştır. Bu canlı bakterilere *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* adını vermiştir. 1930 yılında, Shirota tarafından gastrointestinal sistemden geçerken hayatta kalan laktik asit bakterileri izole edilmiştir [17 ve 18]. 1956'da Lilly ve Stillwell tarafından ise bir mikroorganizma tarafından üretilip, başka bir mikroorganizma için bazı büyüme uyarıcıları salgılayan maddeler olarak tanımlanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) 2001 yılında probiyotikleri “uygun miktarlarda alındığında konakçıya sağlık açısından fayda sağlayan canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlamıştır. Son olarak, 2014 yılında, Uluslararası Probiyotikler ve Prebiyotikler Bilimsel Birliği (ISAPP) probiyotikleri "yeterli miktarlarda alındığında konakçıya sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar" olarak ifade etmiştir [19].

Probiyotiklerin insan vücudundaki önemini anlayabilmek için mikrobiyotaya bakmak gerekmektedir. Sağlıklı bir insan bağırsak sisteminde yaklaşık 500 çeşit mikroorganizma bulunmaktadır [20]. Yenidoğan bir bebeğin bağırsak florası doğum sırasında steril kabul edilmekte fakat anne ve çevresel etkenlerle birlikte değişmektedir (doğum şekli, beslenme vb.). Gastrointestinal floranın fizyolojik ve immünolojik sistemde önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Bu sistemde meydana gelen bir bozukluk, doğum sonrasına uzanan olumsuz sonuçlara neden olmaktadır [21].

Probiyotiklerin bağırsak florasını düzenleyici ve bağışıklık sistemini güçlendirici etki gösterdiği bilinmektedir. Bu etkilerinden bazıları; bakteriyosin üreterek patojen mikroorganizma gelişimini önlemesi, sindirim sistemini teşvik eden enzim üretmesi, antikor düzeyinin artırılması, laktoz intoleransını azaltma, serum kolesterol seviyesini düşürme, obezite-hipertansiyon-allerjik reaksiyonları engellemedir [21].

2.1.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların genel özellikleri

Bir mikroorganizmanın probiyotik kültür olarak tanımlanması için belirli kriterlere sahip olması gerekmektedir. Bu kriterler aşağıda maddeler halinde belirtildiği gibi sıralanabilir [18, 22-27].

- İnsan orjinli olmalıdır yan etki oluşturmamalıdır.
- Patojen özellik içermemeli, toksin üretmemelidir.
- Patojen gelişimini engelleyecek bakteriyosin, asit ya da hidrojen peroksit üreterek antagonist etki göstermelidir.
- Mide asidine ve safra tuzlarına dayanıklı olmalıdır.
- Bağırsak hücrelerine tutunup, burada ve patojen bakterilerin bağırsak translokasyonunu azaltabilmelidir.
- Gastrointestinal sistemde canlılığını devam ettirebilmelidir.
- Metabolik etki gösterebilmelidir.
- Teknolojik süreçlerde (işleme ve depolama) canlılığını ve aktivitesini koruyabilmelidir.
- Gıda ilavelerinde, gıda kalitesini düşürmemelidir.
- Antibiyotik direncinin yayılmaması için stabil olmalıdır. Aktarılabılır direnç genlerine sahip olmamalıdır.
- Çok suşlu preparatlar için uygun olmalıdır.
- İmmun yanıtın uyarılması ve regülasyonu ile bağışıklık sisteminin güçlenmesine yardımcı olmalıdır.

2.1.2. Probiyotik olarak kullanılan bakteriler

Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalardan en çok kullanılanı “Laktik Asit Bakterileri” dir. Laktik asit bakterileri; fermentasyon sonucunda son ürün olarak laktik asit oluşturan, katalaz negatif ve Gram pozitif bakterilerdir [25]. Genel olarak kullanılan probiyotik mikroorganizmalar Tablo 2.1’de belirtilmiştir [28-30].

Tablo 2.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar

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

2.1.3. Probiyotiklerin etki mekanizmaları

Probiyotikler bağırsak mikrobiyotasında laktik asit, asetik asit, formik asit gibi organik asitler üreterek bağırsak pH’sını düşürürler. Böylece Gram negatif patojen özellik gösteren bakterilerin çoğalmasını engeller [28]. Mikrobiyotada mukus üretimini artırarak bariyer bütünlüğünü sağlarlar [14]. Bağırsak yüzeyindeki protoglikanlar aracılığı ile konakçının bağışıklık sistemini uyarırlar [31]. Bakteriyel laktaz enzimi ile laktoz sindirime katkıda

bulunurlar. Bağırsak mukozasındaki patojenleri bağlayarak, karsinojen ajanları inaktive ederek, patojen mikroorganizmalarla rekabete girerek bu mikroorganizmaların tutunma bölgelerini bloke ederler, toksin reseptörlerini yıkıma uğratırlar [30-32]. T hücrelerini aktive eder, Natural Killer hücre aktivesini artırır, Dentritik hücre işlevlerini artırır [33]. Enzim üreterek besinlerin sindirilebilirliğini kolaylaştırır, dekarboksilaz ve deaminaz etkisini inhibe ederek esansiyel aminoasitlerden yararlanımı arttırır, B1, B6, B12 gibi vitaminler üretirler [23].

2.1.3.1. Bakteriyosin üretimi

Patojenik ve bozucu mikroorganizmaların kontrol edilmesi ihtiyacı Louis Pasteur'un çalışmalarına dayanmaktadır. Alexander Fleming ise 1929 yılında yaptığı çalışmalarla *Penicillium notatum* küfünün salgıladığı yapılarla antibiyotiği keşfetmiştir. 'Bakteriyosin' terimi ise 1929 yılında Gratia tarafından keşfedilmiş 1953 yılında *Escherichia coli* tarafından üretilen 'kolikin'i tanımlamak amacıyla kullanılmıştır [34].

Bakteriyosinler; çeşitli bakteriler tarafından sentezlenen, genellikle yakın türler üzerinde inhibitör etki gösteren, antibiyotiklere kıyasla daha dar bir etki spektrumuna sahip olan doğal antimikrobiyal bileşiklerdir [35].

Bakteriyosinlerin molekül ağırlıkları 2000-30000 Da arasında değişmektedir. Genellikle protein yapıdadırlar. Hücre dışı olarak salgılanan Gram + ve Gram - bakteriler tarafından üretilirler. Ribozomal olarak sentezlenerek hücre membranının elektrolitik yük dengesini tahrip etmek suretiyle bakterisidal etki gösterirler. Bakteriyosinlerin antimikrobiyal etki mekanizmaları; hücre duvarı üzerinde gözenekler oluşturup hücre duvarı sentezini, DNA replikasyonu sırasında DNA sentezini, protein sentezinin farklı aşamalarına müdahale ederek ise protein sentezini inhibe etmesi şeklinde olmaktadır [36, 37].

Bakteriyosin üretimi hem Gram + hem Gram - bakteriler tarafından gerçekleşmektedir. Gram + bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler; genetik kodlamalarındaki farklılıklardan dolayı üretici bakteriyi inhibe etmemesi, ürettiği bakteriyosine özgü Gram - bakterilere göre daha fazla evrimleşme göstermesi gibi artı özelliklere sahiptir [38].

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler

Laktik asit bakterileri genellikle güvenli (GRAS) olarak kabul edilen bakteri grubu olduğu için Laktik Asit Bakterileri tarafından salgılanan bakteriyosinler de ABD Gıda ve İlaç İdaresi (USFDA) tarafından güvenilir olarak kabul edilmiştir. Bu bakteriyosinler; ısıya dayanıklı, proteazlara duyarlı, doğal gıda koruyucu olarak nitelendirilen, bakteriyel enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisinde alternatif olarak kullanılabileceği düşünülen, kommensal bakteriler üzerinde hiçbir yıkıcı etki göstermeyen bileşiklerdir [39].

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler yapısal ve fonksiyonel olarak 4 sınıfa ayrılmaktadır.

- I.Sınıf Bakteriyosinler: Lantionin ve B-metillantionin gibi aminoasitleri içeren, moleküler ağırlığı 5 kDa'dan küçük olan lantibiyotiklerdir. Bu lantibiyotikler de içerdiği aminoasit miktarına ve hedef hücreyi öldürme şekillerine göre A ve B Tipi olarak iki gruba ayrılmaktadır. A tipi lantibiyotikler 21-38 aminoasitten oluşurlar ve hedef hücreyi depolarizasyon yöntemi ile inhibe ederler. B tipi lantibiyotikler ise en fazla 19 aminoasitten oluşur, hedef hücreyi enzim inhibisyon yöntemi ile inhibe ederler. Nisin, Enterocin, Subtilin bakteriyosinleri Sınıf I bakteriyosinlerden en yaygın olarak kullanılanlarıdır.
- II. Sınıf Bakteriyosinler: 30-60 aminoasitten oluşan, moleküler ağırlığı 10 kDa'dan küçük olan ve lantionin içermeyen peptitlerdir. Pediosin ve Laktasin bakteriyosinleri bu sınıfta incelenmektedir.
- III. Sınıf Bakteriyosinler: Isıya duyarlıdırlar. I. Sınıf ve II. Sınıf bakteriyosinlere göre daha büyüktürler. Lysostaphin ve Enterolizin A; III. Sınıf Bakteriyosinlere örnek olarak verilebilmektedir.
- IV. Sınıf Bakteriyosinler: Lipit ve karbonhidrat yan gruplarını içeren kompleks bakteriyosinlerdir [40-43].

Bakteriyosinlerin gıda alanında kullanımı oldukça eskiye dayanmaktadır. İlk antibiyotik olan Penicilin'in keşfedilmesiyle birlikte 1928 yılında *Lactococcus lactis* tarafından üretilen 'Nisin' bakteriyosini; 1988'de, ABD'de antibiyotiklerin gıdalarda kullanımının yasaklanmasıyla doğal koruyucu olarak kullanılmaya başlanmıştır [44]. Nisin bakteriyosini; patojen özellik gösteren *Listeria monocytogenes* ve *Clostridium botulinum* bakterileri üzerinde antimikrobiyal etki göstermektedir. Pediocin AcH, Pediocin

PA-1, Lactocin 705, Enterocin bakteriyosinlerinin de *Listeria monocytogenes* bakterisi üzerinde antimikrobiyal etki gösterebildiği incelenmiştir [45].

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler patojenlerle mücadelede benzer aktivite özellikleri gösterdikleri için antibiyotiklere benzetilmektedir. Fakat bakteriyosin ve antibiyotikler arasında birçok farklılık görülmektedir. Bakteriyosinler; antibiyotiklere kıyasla dar bir etki spektrumuna ve yakın akraba türleri üzerinde bakterisidal etkiye sahiptir. Bakteriyosinler ribozomal olarak sentezlenirken antibiyotikler enzimatik işlenme sonucu aktif form kazanırlar. Bakteriyosinler bakterilerin gelişme fazında üretilen birincil metabolitler olarak tanımlanırken antibiyotikler durma fazında üretilen ikincil metabolitler olarak tanımlanmaktadır [46]. Ayrıca laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler; antibiyotiklere alternatif olarak değerlendirilebileceğini düşündüren bazı özelliklere de sahiptirler. Bu özellikler arasında antibiyotiklerin sadece klinik alanda kullanılırken bakteriyosinler klinik kullanımın yanı sıra gıda endüstrisinde de kullanılması, laktisit bakterilerilaktisit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin antibiyotiklere kıyasla daha küçük pH derecelerini tolere edebilmesi, antibiyotikler kullanım sonrasında zararlı metabolitler üretebilirken, bakteriyosinlerde ise bu durum çok daha az görülmesi sayılabilmektedir [43].

2.1.3.2. Asitlik ve safra tuzlarına direnç

Bir mikroorganizmanın probiyotik özellik gösterebilmesi için bağırsak yoluna ulaşmadan önce pH değeri 2,0 civarında olan mideden canlı bir şekilde geçebilmesi gerekmektedir. Safra asitleri ise karaciğerde kolesterolden sentezlenerek safra kesesinden konjuge bir formda on iki parmak bağırsağına gönderilmektedir. Bu asitler kimyasal modifikasyonlara uğrayarak bakterilerin membranlarına zarar verebilmektedir. Muhtemel probiyotik bir bakterinin bağırsakta fonksiyonel etki gösterebilmesi için bu safra tuzlarına karşı dirençli olması gerekmektedir [47].

2.1.3.3. Bağırsak hücrelerine tutunma ve kolonizasyon

Probiyotik özellik gösteren mikroorganizmaların bağırsak epitel hücre yüzeylerine tutunabilmeleri ve burada koloni oluşturabilmeleri; mukozanın iyileşmesinde, patojen mikroorganizmaların tutunmasını önleyerek çoğalmasını engellemede kritik bir öneme sahiptir [46].

Bakterilerin bağırsak epitel hücre yüzeyine yapışması hücre yüzeyinin agregasyon kapasitesi ve hidrofobik özellikleri ile ilgilidir. Agregasyon otoagregasyon ve koagregasyon olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır. Otoagregasyon aynı türe ait mikroorganizmaların; koagregasyon ise farklı türe ait mikroorganizmaların oluşturduğu hücre kolonileri olarak tanımlanmaktadır. Probiyotikler otoagregasyon yetenekleri ile bağırsak epitel hücrelerine tutunabilmekte, koagregasyon yetenekleriyle de patojenlerin bağırsak epitel hücrelerinde kolonizasyonunu önlemektedirler [47].

2.1.4. Probiyotik olarak kullanılan gıdalar

Başlıca probiyotik olarak kullanılan gıdalar; yoğurt, kefir, kıyma, turşu, peynir, tarhana, sirke, şalgam ve fermente ürünlerdir [34].

2.2. Kefir

2.2.1. Kefirin tanımı

Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği'ne göre kefir fermentasyonda spesifik olarak *Lactobacillus kefir*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* ve *Acetobacter* cinslerinin değişik suşları ile laktozu fermente eden (*Kluyveromyces marxianus*) ve etmeyen mayaları (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces exiguus*) içeren starter kültürler ya da kefir tanelerinin kullanıldığı fermente süt ürünü olarak tanımlanmaktadır [10].

2.2.2. Kefirin tarihçesi

Kefir; Balkanlar, Doğu Avrupa ve Kafkaslar başta olmak üzere tüm dünyada tüketilen fermente bir içecektir. İlk olarak Kafkasya'nın Elbrus bölgesinde üretilmiş olan kefir Rusya, Macaristan, çeşitli İskandinav ülkeleri ve 19. yy'da ise Doğu ve Orta Avrupa ülkelerinde

üretilmeye başlanmıştır [49, 50]. Atilla'nın yaptığı seferler sırasında uzun yola dayandıkları için götördükleri keçilerin kefir yaptığı bilinmektedir. Bu nedenle Türkler'in diğer ırklara göre daha güçlü oldukları fark edilmiştir. 1920'lerde Rus bilim adamının probiyotik mikroorganizmalarla ilgili yapmış olduğu çalışmalarda kefirde yoğurda göre 10-15 kat daha fazla probiyotik mikroorganizma içerdiğini bulur. Sağlık açısından önemli olan kefir Dünya'da birçok ülkeye yayılarak vazgeçilmez bir içecek haline gelir. Günümüzde ise farklı boyutlarda şişelerde ve aromalarda geliştirilerek tüketime sunulmaktadır [51, 52].

2.2.3. Kefir daneleri

Kefir daneleri boyları 1-4 cm arasında rengi beyaz ve açık sarı arasında değişen, jelatinimsi dokuda ve karnabahar çiçeği görünümündeki içi boş düzensiz şekildeki yapılardır (Şekil 2.1). Jelatinimsi yapının içeriğini ise laktik asit bakterileri, asetik asit bakterileri, mayaların koloni halinde bulunduğu ekzopolisakkaritler oluşturmaktadır [53]. Bu koloninin %65-80'ini laktobasiller, %20'sini streptokoklar ve %5'ini mayalar oluşturmaktadır [54]. Laktobasiller mikroflorayı oluşturan koloninin daha çok dış kısmında mayalar ise iç kısımlarda bulunmaktadır [12].



Şekil 2.1. Kefir tanelerinin makroskobik yapısı [55]

Kefir danelerinin tür düzeyinde mikrobiyomu incelendiğinde ise *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefir*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus parakefiri*, *Acetobacter* gibi asetik asit bakterileri ve *Kluyveromyces*, *Candida kefir*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida*

kefyr, *Kluyveromyces marxianus*, *Torulaspora delbrueckii* ve *Kazachstania unispora*, *Saccharomyces unisporus*, *Pichia fermentans* gibi birçok maya içermektedir. Mayalar fermentasyon esnasında amino asitler ve vitaminler dahil olmak üzere büyüme için gerekli besinleri üretirler, ortamın pH'ını değiştirirler ve etanol ve CO₂ oluşturularak kefir bakterilerinin büyümesini destekleyen ortamın oluşmasından ve ürünün aroma ve duyuşsal özelliklerinin oluşmasını sağlarlar [56 ve 57].

Kefir danelerinin hücre boyutları ve zincir uzunlukları fizyolojik aşamalara ve yetiştirme koşulları gibi dış etkenlere bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir [58]. Kefir daneleri suda çözünmediği için fermentasyon sonucunda süzülerek tekrar kullanılabilirler [59]. Dane içerisindeki laktik asit bakterileri, mayalar, asetik asit bakterileri simbiyotik bir ilişki sürdürmektedir. Bu bakteri ve mayalar "kefiran" denilen jel kıvamındaki bir polisakkarit matriks içerisinde gömülü olarak bulunmaktadır [60].

2.2.4. Kefirin besin değeri ve bileşimi

Kefir, sütün yapısındaki tüm temel bileşenleri içermekle birlikte fermentasyon sonucu birçok biyoaktif bileşenlerin oluşması, sütte bulunan laktozun parçalanmasıyla daha kolay sindirilebilir hale gelmesi, kefir daneleri yapısındaki mikroorganizmalar aracılığıyla probiyotik etki göstermesi gibi sağlığa birçok fayda sağlamaktadır [12]. Kefir; laktik asit, asetik asit ve etil alkol fermentasyonu sonucu oluşan bir süt ürünüdür. Kefir fermentasyonu sonucu laktik asit, asetik asit, etil alkol, diasetil, asetaldehit gibi bileşenler oluşmakta ve bunlar kefir aromasının oluşumunda rol oynamaktadır [61]. Kefir; zengin bir vitamin ve mineral kaynağıdır. B vitamini türevlerinden B1, B2, B5, B12; A, C ve K vitaminlerin; riboflavin, biotin, tiamin gibi esansiyel aminoasitleri; folik asit, Mg, Ca, P, Zn, Cu, Mn, Fe gibi mineralleri içermektedir (Tablo 2.2) [60 ve 62].

Tablo 2.2. Kefirin içeriği

İçerik	100 gr	İçerik	100 gr
Enerji	65 kcal	Kalsiyum	0,12
Yağ %	3,50	Fosfor	0,10
Protein %	3,30	B12	0,50
Laktoz %	4,00	Süt Asidi g	0,80
Su %	87,50	Kolesterol	13,00
Etil Alkol	0,9	Laktik Asit g	1,00

Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliğine göre kefirin ürün özellikleri belirtilmiş; süt proteini minimum %2.7, süt yağı maksimum %10, titrasyon asitliği en az %0.6, toplam spesifik mikroorganizma sayısı en fazla 10^7 kob/g, maya miktarı en az 10^4 kob/g olmalıdır (Tablo 2.3) [63].

Tablo 2.3. Kefirin Bileşimi

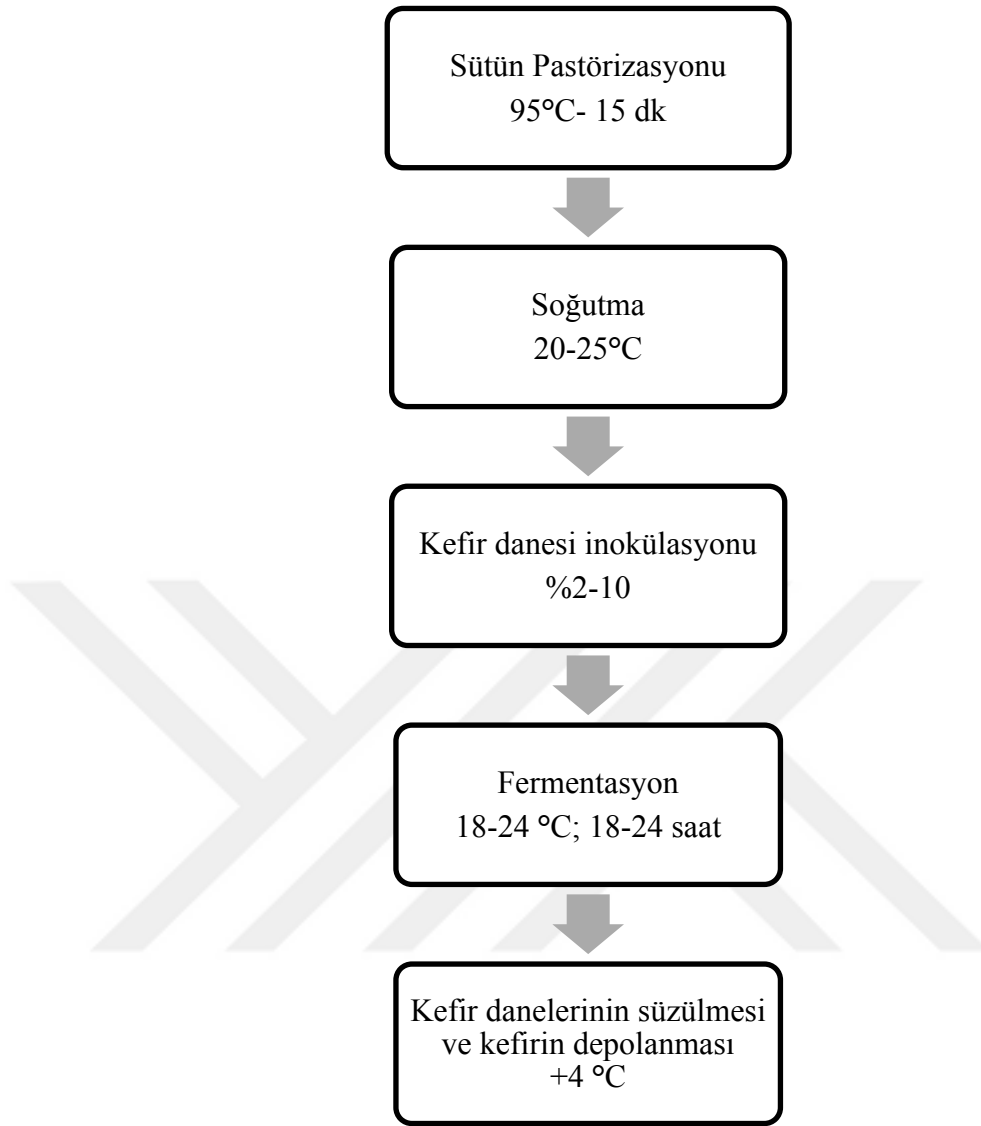
Bileşen	Miktar
Süt Proteini (Ağırlıkça %)	En az 2,7
Süt Yağı (Ağırlıkça %)	En fazla 10
Titrasyon Asitliği	En az 0,6
Toplam Spesifik Mikroorganizma (kob/g)	En az 10^7
Maya (kob/g)	En az 10^4

Kefirin mikrobiyal bileşimi ise kullanılan süt kaynağının türüne, yağ içeriğine, kefir danelerinin mikrobiyal kökenine, sıcaklık-süre vb. gibi fermentasyon parametrelerine bağlı olarak değişmektedir [64].

2.2.5.Kefir üretimi

2.2.5.1.Geleneksel kefir üretimi

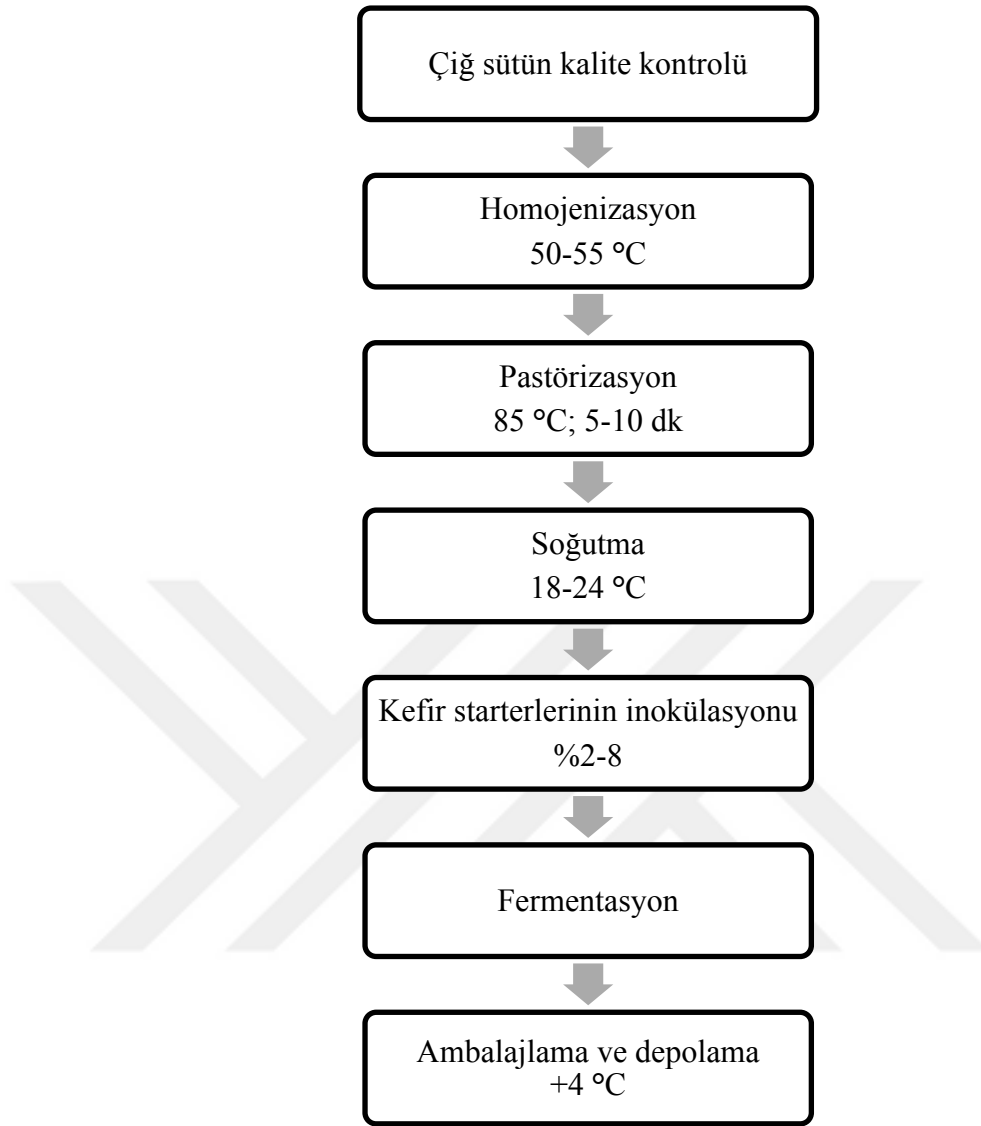
Geleneksel kefir üretiminde; çiğ süt önce yaklaşık 95 °C’ de pastörize edilerek 25 °C’ ye soğutulur. %2-10 oranındaki kefir daneleri 25 °C’deki süte katılarak yaklaşık 18-24 saat arasında karanlık bir ortamda fermentasyon oluşması sağlanır. Fermentasyon sonunda kefir daneleri plastik bir süzgeç yardımıyla süzülür. Daneler +4 °C’de bekletilerek sonraki mayalama işlemlerinde tekrar kullanılabilir (Şekil 2.2) [65 ve 66].



Şekil 2.2. Geleneksel kefir üretimi

2.2.5.2. Endüstriyel kefir üretimi

Endüstriyel kefir üretim aşamalarında birkaç farklı metod kullanılsa da prensip olarak geleneksel kefir üretimine benzemektedir. Geleneksel kefir üretiminden farklı olarak homojenizasyon ve pastörizasyon uygulanmaktadır. Homojenizasyon 70 °C’de, pastörizasyon ise yaklaşık 90 °C’de 5 dk uygulanır. 18-24 saat fermentasyon süresinden sonra sırasıyla soğutma, olgunlaştırma ve ardından depolama işlemi yapılır (Şekil 2.3) [67, 68].



Şekil 2. 3. Endüstriyel kefir üretimi

2.2.6.Kefirin sağlık üzerine etkileri

Son yıllarda sağlıklı beslenme bilincinin artmasıyla birlikte fermente gıdalara duyulan ilgi de artmıştır. Fermentasyon ile gıdaların besin değerini artıran biyoaktif bileşikler ve enzimler oluşmaktadır. Dolayısıyla fermentasyon sonucunda antioksidan ve antimikrobiyal bileşik üretimi, biyo-koruyucu etki artmakta, daha sağlıklı ve etkin bir gıda oluşumu sağlanmış olmaktadır [12].

Fermente bir gıda olan kefirin iyi bir probiyotik kaynağı olmasının yanı sıra antikanserojenik, antialerjik, laktoz intoleransını azaltıcı, kolesterol düşürücü, bağışıklık sistemini, sindirim sistemi ve kan şekerini düzenleyici etkileri de bulunmaktadır [69].

2.2.6.1. Kefirin mikrobiyota üzerine etkileri

Bağırsak mikrobiyotası bağırsakta yaşayan tüm bakteri, virüs, maya ve diğer tüm organizmaları içermektedir. Mikrobiyota terimi tüm bu mikrobiyal bileşimi ifade etmektedir. Fermentasyon; bir mikrobiyal ekosistemin bozulmasına sebebiyet verecek mikropları istila ederek koloni oluşturmalarını önleyen ve gıdanın bileşimini ve bütünlüğünü uzun süre koruyan bir gıda muhafaza şeklidir. Fermente gıdaların tüketimi; bağırsak mikrobiyota bileşimini koruyarak metabolik hastalıkların önlenmesini sağlar [70].

Yapılan güncel araştırmalar; bağırsakta dengeli bir mikrobiyota bileşimi olmadan bireyin tamamen sağlıklı sayılamayacağını göstermektedir. Bağırsak mikrobiyotası, bağışıklık, besin emilimi, enerji metabolizması ve bağırsak bariyer fonksiyonu ile ilgili genler dahil olmak üzere insan bağırsak yolundaki birçok genin ekspresyonunu düzenler [71]. Bağırsak mikrobiyotası üzerindeki değişiklikler ve bozukluklar birçok metabolik hastalık oluşumuna sebep olmaktadır. Bağırsak mikrobiyotasının modülasyonu bu sebeple yüksek önem arz etmektedir. Kefir gibi probiyotik özellikteki fonksiyonel gıdaların tüketimi bağırsak mikrobiyotasını modüle etme, fonksiyonlarını iyileştirme yeteneğine sahiptir. Kolonda üretilen ikincil safra asitlerinin üretimini etkileyerek bağırsak mikrobiyotası üzerinde pozitif yönlü etki gösterdiği, mikrobiyota içerisindeki *Enterobacteriaceae* familyasına ait türlerin azalmasını sağlayarak mikrobiyotayı iyileştirdiği, kefirde meydana gelen biyoaktif bileşenlerin bağırsak geçirgenliğini modüle edebildiği, laktik asit bakterilerinin ve laktik asit bakterilerinin popülasyonunu önemli ölçüde artırdığı, *Enterobacteriaceae*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* oranını önemli ölçüde azaltarak klinik herhangi bir olumsuz etkiye neden olmadan mikrobiyotayı düzenlediği belirtilmiştir [71, 72].

Düzenli kefir kullanımı Ülseratif kolit ve Crohn hastalarında; semptomları iyileştirerek Hemoglobin, C Reaktif Protein, Eritrosit Sedimentasyon hızı gibi parametrelere olumlu yönde etki etmekte; karın ağrısı, gaz ve şişkinlik gibi belirtileri azaltmaktadır [74]. Kefirden izole edilen *Lactobacillus kefir* IBS hastalarında bağırsak mikrobiyotasında T hücreleri tarafından proinflamatuvar sitokin salgısını modüle ederek bağırsak homeostazını sağlamakta

ve bağırsak mikrobiyotasındaki IgA üretimini ve İnterlökin-10 artırarak mikrobiyota üzerinde anti inflamatuvar etki göstermektedir [75, 76].

2.2.6.2. Kefirin laktoz intoleransına etkisi

Laktoz, D-glukoz ve D-galaktoz olmak üzere iki monosakkaritten oluşan bir disakkarittir. Laktozun sindirimi, ince bağırsakta bulunan epitelyum hücreler tarafından salgılanan laktaz enzimi tarafından parçalanmasıyla sağlanmaktadır. Fakat yeterli miktarda laktaz enzimi bulunmadığında laktoz sindirilemez. Laktoz sindirilemediğinde ise emilemeyen laktoz bağırsaktaki bakteriler tarafından fermente edilerek hidrojen, karbondioksit ve metan gibi gazların oluşmasıyla şişkinlik, gaz, diyare gibi şikayetler ortaya çıkar. Bu durum ‘Laktoz İntoleransı’ olarak adlandırılmaktadır [77]. Süt ve süt ürünleri yüksek miktarda laktoz içerir. Kefir oluşumu sırasında sütte bulunan laktozun yaklaşık olarak % 30’u b-galaktosidaz enzimi tarafından parçalanarak glikoz ve galaktoza dönüşür. Bu dönüşüm kefirin; sindirimi hayli miktarda zor olan süte göre laktoz intoleransı olan bireylerde alternatif olarak kullanılabileceğini göstermektedir [62].

Yapılan çalışmalarda fermente ürünler olan kefir ve yoğurdun laktoz intoleransı olan bireylerde gaz şikayetinin %54-71 oranında azalttığı tespit edilmiştir [78]. Laktoz intoleransına sahip 11 birey üzerinde yapılan diğer bir çalışmada *Lactobacillus acidophilus* bakterisinin laktoz sindirimini ve toleransını düzenleyip iyileştirdiği, intoleransa bağlı semptomları azalttığı belirtilmiştir [79].

2.2.6.3.Kefirin antimikrobiyal etkisi

Probiyotikler antimikrobiyal etkisini; ürettiği organik asit, bakteriyosin, biyoaktif bileşiklerin bağırsak epitel hücrelerine tutunması ve buradaki patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu, agregasyonunu, biyofilm oluşumunu önleyici mekanizmalar sayesinde göstermektedir. Fermentasyon sonucunda organik asit ve biyoaktif bileşenlerin birikmesinden kaynaklanan pH değişikliği; gram+ ve gram- bakterilere karşı inhibitör aktivitesini daha geniş bir hale getirir. Bu geniş spektrumlu inhibitör etki; farklı fermentasyon süresi, maya çeşidi, kullanılan ürün çeşidine bağlı olarak fermentasyonun her aşamasında oluşabilecek birçok farklı bileşiklerden kaynaklı değişkenlik gösterebilmektedir [80]. Bu bağlamda 4, 36, 48 ve 72 saat olmak üzere dört farklı zaman diliminde fermente

edilen kefirlerin patojen bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkinliği araştırılmıştır. Çalışma sonunda yüksek oranda antimikrobiyal etki gösterdiği zaman dilimi 36-48 saatlik fermentasyon sonucu elde edilen kefir örneğinin olduğu tespit edilmiştir [81].

Afyon ilinde yapılan bir çalışmada 5 kefir örneğinden *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus durans* türleri izole edilmiş; bu türlerin antimikrobiyal etkili madde ürettikleri ve patojen mikroorganizmalar üzerinde yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olduğu incelenmiştir [82].

Kefirin antifungal ve antimikrobiyal etkisinin incelendiği diğer bir çalışmada ise patojen özellik gösteren *Curvularia*, *Fusarium equiseti* ve *Colletotrichum gloeosporioide* mayalarına karşı yüksek oranda inhibitör etki göstererek antifungal; hücresiz ekstratlarının ise *S. typhimurium*, *S. aureus*, *E. coli*, *B. Subtilis* patojen bakterilerine karşı antimikrobiyal etki gösterdiği bulunmuştur [83].

2.2.6.4. Kefirin obezite ve diyabet üzerine etkisi

Vücut yağ kitlesinin tüm vücut kitlesine göre oranının artması şeklinde tanımlana obezite; son yıllara yanlış beslenme, genetik faktörler, endokrin bozukluklar, hareketsizlik gibi birçok faktöre bağlı olarak giderek yaygınlaşan bir sağlık sorunudur [84].

İnsan bağırsak mikrobiyotasındaki değişiklikler, faydalı ve patojenik bakteriler arasındaki dengesizlikler morbidite ve mortalitenin ana nedenleri olan diyabet, obezite, kardiyovasküler hastalıklara sebebiyet vermektedir [71]. Obezite ve tip 2 diyabet, hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde küresel bir pandemi olarak tanımlanmaktadır. Bu hastalıkların tetikleyici etkenleri ve tedavileri yönünde kesin bir fikir birliği olmamakla birlikte genetik altyapılar, sosyoekonomik durumlar, kültürel ve beslenme alışkanlıkları gibi çevresel faktörler tetikleyici etkenler arasında sayılmaktadır. Özellikle son zamanlarda tedavilerine yönelik yapılan çalışmalarda uygun tedavi ve diyetle birlikte probiyotiklerin takviye edilmesi; HbA1c, plazma glukoz seviyesi ve kilo kaybında etkili olduğu belirtilmiştir [85].

Geleneksel kefir; kilo alımını, plazma kolesterol ve yüksek yağlı diyetle birlikte oluşan karaciğer yağlanması ve trigliserit seviyesini; kefir danelerinde bulunan ekzopolisakkaritler ise vücut ağırlığı ve adipoz doku artışını ve plazma kolesterol seviyesini azaltmaktadır [86, 87]. Metabolik sendromlu bireyler üzerinde; sitokin ve homosistein konsantrasyonlarının

azaltmakta, kan basıncını ve serum apolipoprotein A1 ve apolipoprotein B düzeylerinin dengelemekte, kan glukoza ve lipid seviyesini düşürmektedir [88 ve 89].

Kefirin bir deney grubundaki farelere 12 hafta uygulandığı ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığı bir çalışmada; kefir takviyesi yapılan farelerde kilo artışının daha düşük düzeyde görüldüğü, karaciğerde ve yağ dokusunda yağ asidi oksidasyonu ile ilgili genler yukarı yönlü regüle ettiği bulunmuştur [90]. Kefir tüketiminin kilolu ve obez menopoz öncesi kadınlar üzerinde incelendiği bir çalışmada ise serum lipid seviyelerinde anlamlı derecede düşük olduğu incelenmiştir [91]. İran'da 60 tip 2 diyabetli birey üzerinde yapılan bir çalışmada 2 ay boyunca günde 600 ml kefir takviyesi yapılmış; HOMA-IR'nin yanı sıra serum insülin seviyesini de düşürdüğünü tespit edilmiştir [92]

Diyabetin hiperglisemi, oksidatif stres, nöropati, retinopati, nefropati gibi birçok komplikasyonu mevcuttur. Yüksek kan glukoz seviyesi; hidrojen peroksit ve süperoksit radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin artmasına yol açabilmektedir. Kefir tüketiminin diyabete bağlı böbrek hasarının iyileşmesinde etkili olduğu, hiperglisemiye azalttığı, oksidatif stresi azaltarak ve Nitrik Oksit salınımını modüle ederek böbrek hasarını iyileştirdiği bulunmuştur [93].

2.2.6.5. Kefirin kanser üzerine etkisi

Kefir mutasyon ve DNA hasarını azaltıp β -glukuronidaz, nitroreduktaz, azoreduktaz gibi kanser oluşumuna sebebiyet verebilecek enzimlerin aktivitesini azaltarak kanserli hücrede apoptozisi artırmaktadır [94]. Kefirin glioblastoma üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada; üretilen organik asitler, bakteriyosin ve metabolitlerin; proliferasyon düzenlemesi, hücre ayrımı, apoptoz, metastaz ve anjiyogenez gibi metabolit yollarına müdahale ederek U87 hücre hattının büyüme oranını önemli ölçüde azalttığını göstermiştir [95]. Kanser sürecinde kemoterapi görmüş hastalarda kemoterapi sonrasında on iki haftalık kefir tüketimi, yağsız vücut kütleini, depresyonu, yorgunluğu, mide sıkıntısını ve bağırsak disbiyozunu iyileştirmiş; monosit sayılarını düzenlemiştir [96].

2.3. Kanser

Kanser terimi ilk kez Hipokrat tarafından tümörü tanımlamak için ‘karsinom’ ve ‘karkinos’ terimlerinden türetilmiştir [97]. Kanser; vücuttaki bir grup hücrenin aşırı ve kontrolsüz çoğalarak yaşamı tehdit eden, ölüme sebebiyet veren tüm dünyada ve ülkemizdeki en büyük sağlık sorunlarından biridir. Oluşum nedenleri ise, kalıtsal faktörler, genetik mutasyonlar, hormonal bozukluklar gibi genetik nedenler ve kimyasal faktörler radyasyon vb. gibi çevresel nedenler; sigara kullanımı, beslenme bozuklukları olarak sınıflandırılabilir [98 ve 99].

Kanserli bir hücrenin büyümesinde çoğalmasında; apoptozis mekanizmasındaki problemler, hücre proliferasyonunu istenmeyen biçimde uyaran genetik defektler, tümör baskılayıcı genlerdeki bozukluklar ve tümör anjiyogenez gibi 4 mekanizma önemli bir rol oynamaktadır [100].

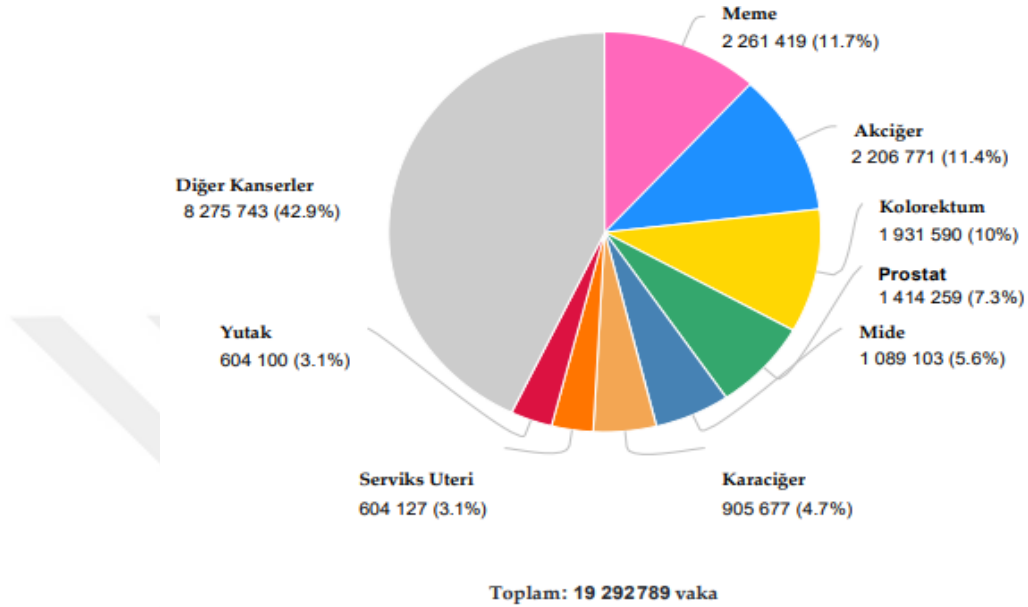
Kanserli bir hücreyi normal hücrelerden ayıran birçok farklı özelliği mevcuttur. Bu özellikler aşağıdaki gibi sıralanabilmektedir [101].

- Hücre yüzeyindeki reseptörleri çok daha sık sinyal iletir.
- Kontrolsüz şekilde çoğalmayı sağlayan kendi sinyal sistemleri vardır.
- Telomeraz aktivitesini koruyarak büyümeye ve çoğalmaya anormal bir hızda devam eder.
- Şeker normal hücreler oranla yaklaşık 100 kat fazla olarak kandan alırlar ve laktat üreterek enerji sağlarlar (Warburg etkisi)
- Gerekli besin ve oksijeni almak üzere çevrelerindeki stromayı etkileyerek yeni damar sistemleri oluşturabilirler
- Dolaşım sistemine girip uzaktaki bir yere hareket edebilir ve yeni bir yerleşerek metastaz oluştururlar.
- Genetik ve epigenetik olarak stabil değildirler.

Dünya Sağlık Örgütü - Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) 2020 dünya kanser istatistikleri verilerine göre, meme, akciğer, kolorektal, prostat ve mide kanserinin görülme olasılığı en yüksek ilk 5 kanser türü olduğunu belirtmiştir (Şekil 2.4) [102].

Dünya Çapında yapılan çalışmaların %60'ından fazlası kanserin tedavisi için yeni yöntemler keşfetmek üzerinedir. Tedavi seçimleri; kanserin türüne, evresine, lokalitesine

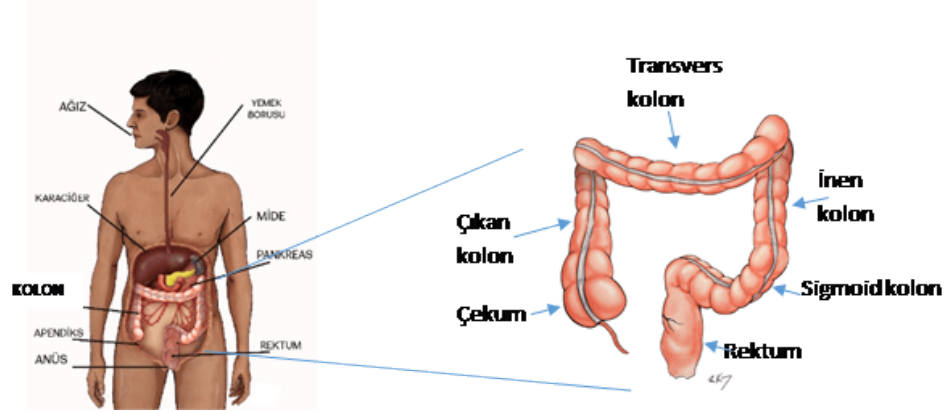
bağlı olarak değişmektedir. Yaygın olarak cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi seçenekleri kullanılsa da hormon ve kök hücre bazlı tedaviler, immünoterapi, kombine ve alternatif tedavi yöntemlerine dair çalışmalar yoğunluk kazanmıştır [97].



Şekil 2.4. 2020 yılına ait kanser vaka oranları [102]

2.3.1. Kolorektal kanser

Kalın bağırsak, ortalama 150 cm uzunluğunda olup çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon, rektuma kadar uzanan kısımlardan oluşmuş sindirim kanalının önemli bir bölümüdür (Şekil 2.5) [103].

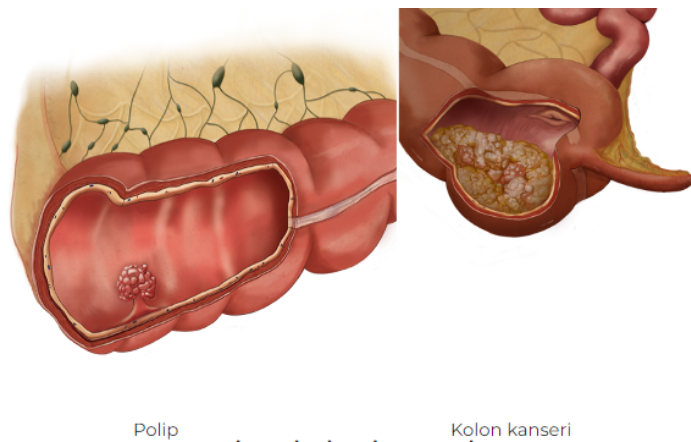


Şekil 2.5. Kolonun anatomik bölümleri [104]

Kolorektal kanser oluşumu; epitel mukozasında oluşan bir polipin hiperproliferatif epitele dönüşmesiyle başlar. Bu hücreler kendi yapılarını kaybettiklerinde adenom oluşturur. Oluşan adenomlar yayılarak kanser oluşumuna sebep olur (Şekil 2.5) [105 ve 106].

Kolon kanserinin oluşması ve yayılması 5 evreden oluşmaktadır.

- Evre 0 normal hücrelerin kolon mukozasında birikmeye başladığı,
- Evre 1 kolon mukozasından submukozaya sızdığı,
- Evre 2 serosa tabakasına sızdığı ve burada yayılım gösterebildiği,
- Evre 3 kanser kolon duvarının mukozasından submukozaya giderek lenf nodlarına yayılabildiği,
- Evre 4 kan damarları ve lenf nodları ile birçok organa yayılım gösterdiği evredir [107].



Şekil 2.6. Kalın bağırsakta polip ve kanser oluşumu [106]

Kolon kanserinin ilk seviyelerinde semptomlar belli değildir. Daha sonraki evrelerinde kilo kaybı rektal kanama gibi belirtiler söz konusudur. Tedavisinde ilk evrelerde kanserli doku ameliyatla alınırken, ilerleyen evrelerde kemoterapi ve radyoterapi uygulanır. Kolon kanseri hastalarında ayrıca biyoterapotik olarak bilinen probiyotiklerde hastalığın yinelenmesinin önlenmesinde, yan etkilerin azaltılmasında kullanılmaktadır. Özellikle Probiyotiklerin ürettikleri sekonder metabolitler sayesinde hücre çoğalması, farklılaşma ve kolon kanser riskini azalttığı gözlemlenmiştir [108].

Kolon kanseri oluşumunda kalıtsal faktörler etkili olabildiği gibi birçok çevresel etmenler de etkilidir. Bu etmenler arasında yaş, cinsiyet, ülseratif kolit- crohn gibi inflamatuvar bağırsak hastalığı öyküsü, yanlış beslenme, obezite, sigara ve alkol tüketimi sayılabilmektedir [109].

3. MATERİYAL METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kefir örneklerinin temini

Bu tez çalışmasında 15 farklı kefir örneği (12 adedi ticari, 3 adedi ev yapımı) kullanılmıştır. Ev yapımı örnekler steril cam kaplarda, ticari örnekler ise orijinal ambalajında (Amasya) satın alınarak aseptik koşullarda ve soğutucu çanta yardımıyla soğuk zincir bozulmadan Amasya Üniversitesi Biyolojik aktivite laboratuvarına getirilmiştir. Kefir örnekleri fizikokimyasal ve mikrobiyolojik analizleri yapılncaya kadar +4°C’de bekletilmiştir. pH, toplam asitlik ve mikrobiyolojik analizler eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiş olup, kuru madde ve kül analizleri için örnekler -20 °C’de depolanmıştır.

3.1.2. Tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasallar

Çalışmada; pepton water (Biolife, Milan, Italy), De Man Rogosa ve Sharpe agar (MRSA, Biolife, Milan, Italy), De Man Rogosa ve Sharpe broth (MRSB, Biolife, Milan, Italy), M17 broth (Biolife, Milan, Italy), Brain Heart Infusion broth (Biolife, Milan, Italy), H₂O₂ (Norateks), Gram boyama seti (Norateks), Triple sugar iron agar (Merck, Germany), Fenolftalein (Sigma), NaOH (Sigma), NaCl (Sigma), Dulbecco’s modified eagle’s medium L-glutamin ve yüksek glukoz içeren (DMEM, Sigma D5648), eagle's minimum essential medium (EMEM, Sigma M5650) penisilin-streptomisin antibiyotiği (Sigma P4458), tripsin-EDTA (Sigma, T4049), fetal sığır serumu (FBS, Sigma, F7524), NaHCO₃ (Sigma, S5761), tripan mavisi (Sigma, T8154), dNTP karışımı (Thermo Fisher Scientific, R0191), Taq DNA polimeraz (Thermo Fisher Scientific, EP0402) ve DNA jel yükleme boyası (Thermo Fisher Scientific, R0611), primer (oligomer biotechnology) 100 bç DNA ladder (GENESTA™) kimyasalları kullanılmıştır.

Antibiyotik duyarlılık testi için kullanılan antibiyotikler Ampisilin (AMP, 10 µg, ASD00200), gentamisin (CN; 10 µg, ASD04405), metisilin (ME, 30 µg, ASD05441), penisilin (P, 10 µg, ASD07400), Trimetoprim/Sulfametaksazol (SXT, 1,25/23,075, ASD09320), Vankomisin (VA, 30 µg, ASD09400) Biyoanalase firmasından temin edilmiştir.

3.1.3. Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar

Analitik hassas terazi (Shimadzu, Japonya), -86 °C derin dondurucu (Thermo Scientific, ABD), +4 °C ve -20 °C buzdolabı (Arçelik), otoklav (Nüve), sınıf II kabin (Thermo Scientific, ABD), inkübatör (Mettler, Almanya), pH metre (İsolab), Desikatör, CO₂ inkübatör (Mettler, Almanya), vorteks (IKA, Almanya), ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (IKA, Almanya), mikrosantrifüj (Heidolph, Almanya), pH metre (İsolab 61601001), UV transilüminatör, PZR cihazı (TurboCycler Lite 9020, Blue-Ray, Bio-tech), yatay elektroforez sistemi, ultra saf su cihazı (Merck, Millipore), Real-Time PCR (Piko Real 96 Thermo Scientific), mikropilaka okuyucu (Multiscan GO, Thermo Scientific), inverted mikroskop (Leica, Almanya) marka ve modelde cihazlar kullanılmıştır.

3.1.4. Besiyeri ve çözeltilerin hazırlanışı

3.1.4.1. De Man Rogosa ve Sharpe agar

Ticari besiyeri 70,2 g/L olacak şekilde su banyosu içinde tam olarak çözündürülmüştür. pH 6,4±0,2'ye ayarlanmış 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiş ve yaklaşık olarak 45 °C sıcaklığa düşünce petrilere dökülerek katılaşması sağlanmıştır.

3.1.4.2. De Man Rogosa ve Sharpe broth

Ticari besiyeri 55,2 g/L olacak şekilde soğuk su içerisinde hazırlanarak pH 6,4±0,2'ye ayarlanmış 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilerek kullanılmıştır.

3.1.4.3. M17 broth

Ticari besiyeri 42,2 g/L olacak şekilde su banyosu içinde tam olarak çözündürülmüştür. pH 7,2±0,2'ye ayarlanmış 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilerek kullanılmıştır.

3.1.4.4. Mueller Hinton agar

Ticari besiyeri 34,0 g/L olacak şekilde su banyosu içinde tam olarak çözündürülmüştür. pH 7,2±0,2'ye ayarlanmış 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiş ve yaklaşık olarak 45 °C sıcaklığa düşünce petrilere dökülerek katılaşması sağlanmıştır.

3.1.4.5. Fizyolojik tuzlu su

Fizyolojik tuzlu su çözeltisi için NaCl 8,5 gr/L olacak şekilde distile su içerisinde tam olarak çözündürülüp 121°C’de 15 dk otoklavda steril edilerek kullanılmıştır.

3.1.4.6. Tris-Borik asit- EDTA tamponu (TBE, 10X)

Tampon Trizma base 108 g/L, Borik asit 55 g/L, EDTA 7,5 g/L (pH 7,5-7,8) olacak şekilde dH₂O ile çözülerek hazırlanmıştır. 10X TBE tamponu çalışmalar sırasında 1X’e seyreltilerek kullanılmıştır.

3.2. Fizikokimyasal Analizler

Bu amaçla kefir örneklerinin pH değeri, toplam asitlik, kuru madde ve kül miktarı analiz edilmiştir. Analizler 2 paralelli olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. pH değeri

Kefir örneklerinin pH değeri birleşik elektrotlu pH metre (ISOLAB) ile ölçülmüştür. Daha önce tampon çözelti (pH 4, pH 7) ile standardize edilen pH metre probu kefir örneğine daldırılarak pH metrede sabit bir değer elde edilene kadar bekletilmiş ve sonuç kaydedilmiştir [110].

3.2.2. Toplam asitlik

10 mL kefir örneği üzerine 1 mL fenolfitalein indikatörü ilave edildikten sonra 0,1 M sodyum hidroksit (NaOH) ile kalıcı açık pembe renk elde edilinceye kadar titrasyon yapılmıştır. Başlangıç NaOH miktarı kaydedilmiştir. Titrasyon sonrası harcanan NaOH miktarı da kaydedilerek toplam asitlik miktarı % laktik asit olarak hesaplanmıştır [111].

$$\% \text{ Asitlik} = [(V \times N \times 0,09) / m] \times 100$$

A : Laktik asit cinsinden, titre edilebilir asitlik değeri (kütlece yüzde)

V : Titrasyonda kullanılan NaOH miktarı (hacim) (mL)

m : Numune ağırlığı (g)

N : NaOH çözeltisinin normalitesi

3.2.3. Kuru madde miktarı

Kuru madde tayini gravimetrik yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yıkanmış ve kendi haline bırakılarak kurutulmuş cam petriler, sabit tartıma getirilmesi için $105 \pm 2^\circ\text{C}$ etüvde 2 saat bekletilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığına gelmesi için desikatöre alınan cam petrilerin hassas terazide darası alınmıştır. 3-5 g kefir örneği tartılan petriler $105 \pm 2^\circ\text{C}$ etüvde 3-4 saat bekletilerek kurutulmuştur. Etüvden çıkarılan petriler desikatörde soğutulduktan sonra hassas terazide tartılmış ve % kuru madde miktarı hesaplanmıştır [112].

$$\% \text{ KM} = [(M2 - M) / (M1 - M)] \times 100$$

M : Kroze ağırlığı (g)

M1 : Numune ve kroze ağırlığı (g)

M2 : Kroze ağırlığı ve kurumuş kefir numunesi ağırlığı (g)

3.2.4. Kül miktarı

Yıkanmış ve kendi haline bırakılarak kurutulmuş porselen krezeler, sabit tartıma getirilmesi için $105 \pm 2^\circ\text{C}$ etüvde 3-4 saat bekletilmiştir. Oda sıcaklığına gelmesi için desikatörde bekletilen krezelerin hassas terazide darası alınmıştır. 3-5 g kefir örneği tartılan krezeler, örnekten sıçrama olmaması için $105 \pm 2^\circ\text{C}$ etüvde 1-2 saat bekletildikten sonra kül fırınına alınmıştır. Kül fırınının sıcaklığı kademeli olarak artırılarak örnekler 550°C 'de 4 saat yanmaya bırakılmıştır. Yakma işlemi sonunda örnekler desikatöre alınarak soğutulmuş ve hassas terazide tartıldıktan sonra % kül miktarı hesaplanmıştır [112].

$$\% \text{ Kül} = [(G2 - G) / (G1 - G)] \times 100$$

G : Kroze ağırlığı (g)

G1 : Numune ve kroze ağırlığı (g)

G2 : Kroze ağırlığı ve kül ağırlığı (g)

3.2.5. İstatistik analizi

Kefir örneklerinin fizikokimyasal analiz sonuçlarını istatistiksel olarak değerlendirmek için SPSS 25 paket programı kullanılmıştır. Analiz sonuçlarına t testi uygulanmıştır. Analiz % 95 güven aralığında gerçekleştirilmiştir.

3.3. Bakterilerin İzolasyonu

3.3.1. Laktik asit bakterilerinin saflaştırılması ve muhafazası

Çalışmada kullanılan kefir örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonunda klasik kültür tekniği uygulanmıştır. Bu amaçla öncelikle ve aseptik teknikler doğrultusunda steril gıda numune poşeti içerisine 10 mL kefir örneği ilave edilerek üzerine 90 mL % 0,1 oranında tamponlanmış peptonlu su ilave edilmiştir [113]. Yaklaşık olarak 4-5 dk karıştırılarak seyreltme oranı 1:10 (10^{-1}) olacak şekilde ilk dilüsyon elde edilmiştir. Homojenizasyon işlemi sırasında yapılan 10^{-1} lik ilk dilüsyondan 10^{-7} 'ye kadar desimal dilüsyonlar hazırlanmıştır. Bu amaçla önceden hazırlanmış 9 mL tamponlanmış peptonlu su içeren tüplere öncelikle 10^{-1} lik dilüsyondan 1 ml alınıp ilave edilip vorteks yardımı ile karıştırılıp homojen hale getirilerek 10^{-2} 'lik dilüsyon hazırlanmıştır. Bu şekilde seyreltme işlemi 10^{-7} 'ye ulaşmaya kadar aynı şekilde devam etmiştir. Hazırlanan dilüsyonlardan 0,1 mL alınarak De Man Rogosa ve Sharpe (MRS), M17 agar üzerine steril edilmiş cam drigalski yardımıyla homojen bir şekilde inoküle edilmiştir. Ekim yapıldıktan sonra 37 °C'de 48-72 saat anaerobik şartlarda inkübasyona bırakılmıştır [114].

İnkübasyon sonrasında MRS ve M17 agar üzerinde üremiş laktik asit bakterisi olmasından şüphe edilen koloniler (mat, krem rengi, beyaz, küçük) seçilerek MRS broth ve M17 broth besiyerinde geliştirildikten sonra tekrar katı besiyerine ekimi yapılarak saf kültürler elde edilmiştir [86]. İleride yapılan fenotik ve genotipik testler için %20 gliserol içeren Brain Heart Infusion Broth içerisinde -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Çalışmalarda pozitif kontrol olarak *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 kullanılmıştır.

3.4. Laktik Asit Bakterilerinin Fenotipik Olarak Tanımlanması

3.4.1. Katalaz testi

MRS agar'da üretilen taze bakteri kültürlerinden steril bir öze ile alınarak temiz bir lam üzerine konulmuştur. Üzerine %3'lük H_2O_2 ilave edilmiş ve gaz çıkışının oluşup oluşmayacağı gözlemlenmiştir. Katalaz enzimi bulunan bakterilerde H_2O_2 su ve oksijene kadar parçalanması sonucu gaz çıkışı oluşmaktadır. Gaz çıkışının olması katalaz pozitif, gaz çıkışının olmaması katalaz negatif olarak değerlendirilir [115].

3.4.2. Gram boyama

MRS agarda üretilecek taze kültürlerden steril öze ile alınacak bakteri kolonisi ile su damlatılmış lam üzerinde smear oluşturulmuştur. Havada kurutulduktan sonra ateşten geçirilerek fiksasyon işlemi yapılmıştır. Hazırlanmış preparatlar ilk önce 1 dk kristal viyolele ile boyanmıştır. Süre sonunda boya su ile uzaklaştırıldıktan sonra 1 dk boyunca lugol ile boyanmış ve fazla boya su ile uzaklaştırılmıştır. Preparat alkol ile yaklaşık olarak 15 sn bekletilerek tekrar su ile yıkanmıştır. Ardından son boya olan safranin ile 1 dk boyanarak su ile yıkanıp kurutulmuştur. Mikroskop ile görüntülenmiş ve mor renkli bakteriler Gram +, pembe renkli bakteriler ise Gram - olarak değerlendirilmiştir [116, 117].

3.5. Kefir Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Özellikleri

3.5.1. Laktik asit bakterilerinin farklı sıcaklıklarda gelişimi

Kefirden izole edilmiş laktik asit bakterilerinin farklı sıcaklıklarda gelişiminin olup olmadığını test etmek amacıyla taze bakteri kültürleri MRS broth ve M17 broth ekilmiş ve 4°C, 15°C ve 45°C’de 2-7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda bulanıklık görülen tüpler pozitif olarak değerlendirilmiştir [118].

3.5.2. Laktik asit bakterilerinin farklı tuz konsantrasyonlarında gelişimi

Laktik asit bakterilerinin farklı tuz konsantrasyonlarında gelişiminin olup olmadığını değerlendirmek amacıyla 24 saatlik taze bakteri kültürleri %6, %7,5 ve %10 NaCl içeren MRS broth ve M17 besiyerine inoküle edilmiş ve petriler 2-7 gün süreyle 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında, bulanıklık görülen tüpler pozitif olarak değerlendirilmiştir [118].

3.5.3. Laktik asit bakterilerinin farklı pH derecelerinde gelişimi

Laktik asit bakterilerinin yüksek asidik ya da yüksek bazik ortamında gelişip gelişmediğinin belirlenmesi amacıyla 24 saatlik taze kültürler MRS broth ve M17 besiyerine pH’sı 4, 7 ve 10’a ayarlanarak inoküle edilmiş ve 37°C’de 2-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bulanıklık görülen tüpler pozitif olarak değerlendirilmiştir [118].

3.5.4. Laktik asit bakterilerinde hidrojen sülfür oluşumu

Laktik asit bakterilerinin şekerleri fermentasyonu sonucu gaz ve hidrojen sülfür (H_2S) oluşumunu gözlemlemek için 24 saatlik taze kültürler Triple Sugar Iron (TSI) slant besiyerine inoküle edilmiştir. $37^\circ C$ 'de 48-96 saatlik inkübasyon sonrasında, tüplerdeki gaz çıkışı ve renk değişimi dikkate alınmıştır [113].

3.5.5. Laktik asit bakterilerinin antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi

İzolatların çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılık profillerini belirlemek amacıyla Kirby - Bauer Disk Difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla ampicilin, gentamisin, metisilin, penisilin, sülfometoksazol/trimetoprim ve vankomisin olmak üzere toplam 6 antibiyotik test edilmiştir. Bu test için öncelikle Laktik asit bakterileri 0,5 McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ CFU/mL) bulanıklığında ayarlanmıştır. Hazırlanan süspansiyonlar Mueller Hinton Agar üzerine steril bir eküvyonla her tarafına eşit bir şekilde olacak şekilde yayma ekim yapılmıştır. Ardından belirtilen antibiyotikler steril bir pens yardımı ile petri üzerine bırakılmıştır. Ardından $37^\circ C$ 'de 24 – 48 saat uygun koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresinden sonra zon çapları bir kumpas yardımıyla ölçülerek sonuçlar değerlendirilmiştir. [119 ve 120].

3.5.6. Bakteriyosin üretiminin ve antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi

Fenotik ve genotipik yöntemlerle laktik asit bakterisi olarak doğrulanan izolatların antimikrobiyal etkisini belirlemede kuyu difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Öncelikle 10 mL MRS brotha canlandırılmış izolatlar 10000 rpm'de 10 dk $4^\circ C$ 'de santrifüj edilmiştir. Süre sonunda süpernatantlar şırınga yardımıyla çekilmiş. Süpernatantın sterilizasyonu için 0,45 μL 'lik membran filtreden geçirilerek hücresiz filtratlar elde edilmiştir [121].

Elde edilen bakteriyosinin antibakteriyel aktivitesinin belirlenmesi için agar kuyu difüzyon testi kullanılmıştır. Bu yöntemde öncelikle *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 7064, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Streptococcus mutans* ATCC 35668, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 ve *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 bakterileri Brain Heart Infusion (BHI) brotha canlandırıldıktan sonra 0,5 Mc Farland'a ayarlanmıştır. Hazırlanan süspansiyonlar MHA üzerine tüm yüzeyi kaplayacak şekilde steril bir swap ile yayma ekim yapılmıştır. Sonra üzerine steril bir aparat yardımıyla delikler açılmıştır. Açılan bu deliklere 100 μL olacak şekilde farklı laktik asit bakterilerine ait süpernatantlar ilave edilmiş ardından $37^\circ C$ 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır [122].

3.5.7. Otoagregasyon testi

Bu test için öncelikle izolatlar 37°C’de anaerobik ortamda 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. Süre sonrasında sonrası pH’sı 6,2 olan PBS içerisinde 0,5 McFarlanda ayarlanmıştır. Hazırlanan süspansiyon lam üzerine damlatılmış ve ışık mikroskobu ile görüntülenmiştir. Görüntülenme sonucunda 2 dk içerisinde agregasyon olması pozitif olarak değerlendirilmiştir [123].

3.6. Laktik Asit Bakterilerinin Genotipik Olarak Tanımlanması

Laktik asit bakterileri için cins özgü olan 16S rRNA primerleri kullanılarak PZR yöntemi ile cins düzeyinde identifiye edilmiştir. Tür düzeyinde identifikasyon için spesifik olan primerler kullanılarak tür düzeyinde tanımlanmıştır. İlk olarak DNA izole edilecek ardından PZR ile DNA amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. DNA bantlarını görüntülemek amacıyla etidyum bromürde boyandıktan sonra UV transliminatör yardımı ile görüntülenmiştir. Bu çalışmada kullanılacak primerler (27F ve 1492R) Tablo 3.1’de belirtilmiştir.

Tablo 3.1. PZR çalışmasında kullanılmış olan primer dizileri

Primerin adı	5'→3'	bç	Kaynak
16S rRNA			
27 F	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	1500	[116]
1492 R	TACGGCTACCTTGTTACGACTT		

Oligomer Bioteknoloji tarafından 100 µM konsantrasyonda sentezlenmiştir. Stok çözeltiliden 1:10 olarak ddH₂O ile seyreltme yapılarak hazırlanan 10 µM konsantrasyondaki primerler elde çalışmada kullanılmıştır.

3.6.1. DNA izolasyonu ve miktar tayini

Fenotipik olarak laktik asit bakterisi olduğu düşünülen örneklerden DNA izolasyonu için kaynatma yöntemi kullanılmıştır. Bu amaç için 24 saatlik kültürleri hazırlanan izolatlardan 1 öze dolusu koloni alınarak 500 µl steril saf su içine alınıp homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra 95 °C’de 10 dakika süre ile kuru blok ısıtıcıda bekletilmiştir. Daha sonra 12000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir [124]. Santrifüj işlemi sonrasında genomik DNA’ları içeren süpernatant kısımları, bir steril tüp içerisine alınmıştır. DNA miktar ve konsantrasyonunun belirlenmesi için. A260/A280 nm’de absorbansı 1,8-1,9 arasında olan saf

DNA örnekleriyle çalışmaya devam edilmiştir. Belirtilen değerler dışında elde edilen DNA örnekleri için yeniden izolasyon gerçekleştirilmiştir. Template DNA'lar daha sonraki çalışmalarda kullanılmak için -20°C'de depolanmıştır.

3.6.2. DNA amplifikasyonu

Laktik asit bakterilerinin tür düzeyinde tanımlanması için çalışılacak gen bölgelerinin çoğaltılması işlemi sonucunda DNA bantlarının daha iyi görüntülenebilmesi için öncelikle optimizasyon yapılmıştır. Çalışılacak gen bölgeleri için reaksiyon bileşenleri Tablo 3.2'de gösterildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon son hacmi toplam 25 µL olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan master mix şekilde hazırlanacak reaksiyon ise Tablo 3.3'te verilen koşullarda gerçekleştirilmiştir.

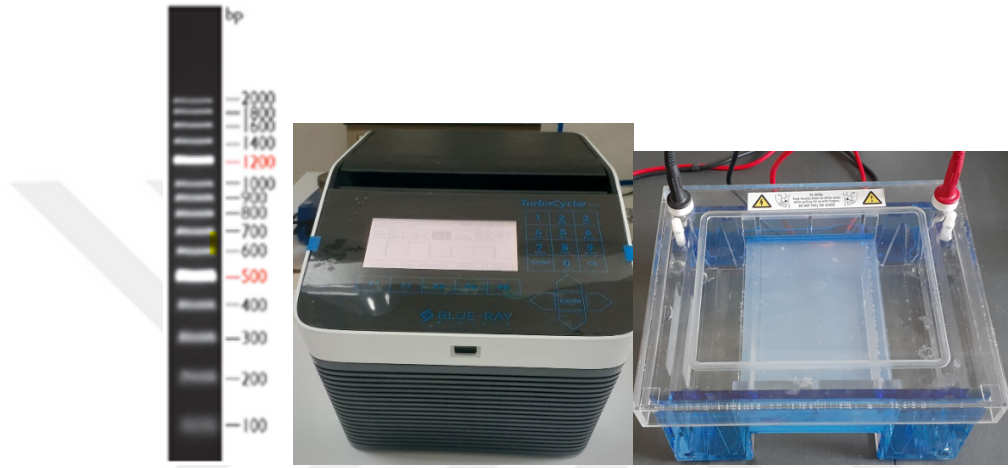
Tablo 3.2. PZR reaksiyon bileşenleri

PZR bileşeni	Hacim (µL)	Konsantrasyonu
Taq tamponu (10X)	2,5	1X/ µL
MgCl ₂ (25 mM)	1,5	1,5 mM/ µL
dNTP mix (2 mM)	1	0,08 mM/ µL
Primer Forward (10 pmol/µL)	0,5	0,2 pmol/ µL
Primer Reverse (10 pmol/µL)	0,5	0,2 pmol/ µL
Taq DNA polimeraz (5U/µL)	0,25	0,05 U/ µL
Kalıp DNA 30 (ng/µL)	1	1,2 ng/ µL
dH ₂ O	17,75	-
TOPLAM	25	-

Tablo 3.3. PZR reaksiyon koşulları

Basamak	Sıcaklık (°C)	Dakika	Döngü
Ön denatürasyon	95	3 dk	1
Denatürasyon	94	5 dk	34
Bağlanma	58	1,5 dk	
Uzaman	72	2 dk	
Son uzama	72	5 dk	1

PZR sonrası elde edilen ampikonlardan 10 μ L alınarak 2 μ L 6X yükleme tamponu ile homojen bir şekilde karıştırılıp %1'lik (w/v) agaroz jele yüklenmiştir (Resim 3.1). DNA örnekleri 90 volt elektrik akımında 90 dk koşturulmuştur. Jel 5 μ g/mL etidyum bromür içerisinde 20 dk boyunca bir çalkalayıcıda bekletilerek DNA bantları bir UV transliminatör yardımıyla görüntülenmiş 1500 bp'lık gen bölgesine gelen bantlar laktik asit bakterisi olarak değerlendirilmiştir.



Resim 3.1. Kullanılan DNA laddera ait fragment profili, PZR ve jel elektroforezi

3.7. Dizi Analizi

Laktik asit bakterilerinin tür düzeyinde tanımlanmasında izolatlara ait 16S rRNA ürününün sekans analizi (27F/1492R) BM Labosis (Ankara) firması aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Her iki primer okuması sonucunda elde edilen sekanslar BioEdit programı ile birleştirilmiş ve NCBI Nuclotide BLAST¹ programı kullanılarak Gen bankasında en yakın ilişkili tür belirlenmiştir.

¹ (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)

3.8. Laktik Asit Bakterilerinden Üretilen Ekzopolisakkaritlerin Sitotoksik Aktivitesinin Belirlenmesi

3.8.1. Ekzopolisakkarit izolasyonu

Laktik asit bakterileri MRS brotha inoküle edilerek 36,5 °C 'de 48 saat anaerobik şartlarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 6000 rpm'de 20 dk süresi ile santrifüj edilmiştir. Ardından üstte oluşan sıvı alınarak %20 konsantrasyonunda trikloroasetik asit ilave edilerek +4 °C'de bir gece bekletilmiştir. Süre sonunda örnekler 10000 rpm' de +4 °C'de 30 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Süpernatant alınarak üzerine 1:1 hacimde etanol ilave edilerek -20 °C 'de 24 saat bekletilmiştir. Süre sonrasında 10000 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiş ve pellet belirli konsantrasyonlarda çözdürülerek ekzopolisakkarit olarak kullanılmıştır [125].

3.8.2. Hücre kültürü ve kültür şartlarının hazırlanması

Çalışmamızda, insan kolon adenokarsinoma hücre hattı (DLD-1 cell line, epitel hücre, ATCC CLL-221™) ve insan normal kolon hücre hattı (CCD-18Co cell line, fibroplast hücre, ATCC CRL-1459™) kullanılmıştır. Hücreler Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Uygulama Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi hücre kültürü stoğundan temin edilmiştir. DLD-1 hücrelerinin çoğaltılması için %10 (v/v) fetal bovin serum (FBS), %1 L-glutamin, 100 ünite/mL penisilin/streptomisin, %9,2 NaHCO₃ içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kullanılmıştır. CCD-18Co hücreleri ise %10 (v/v) fetal bovin serum (FBS), %1 L-glutamin, 100 ünite/mL penisilin/streptomisin, %9,2 NaHCO₃ içeren EMEM besiyeri kullanılmış ve %5 CO₂ atmosfer ortamında %95 nem ortamında inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin pasajlanmasında ise %1'lik Trypsin/EDTA kullanılmıştır.

3.8.3. Hücre sitotoksosite testi

Hücreler üzerinde sitotoksitenin belirlenmesinde kullanılan 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT) testi hücre canlılığını ifade eden bir testtir. Hücreler uygun besin ortamlarında büyütüldükten sonra yaklaşık olarak %80 doluluk oranına ulaştıklarında hücre sayıları belirlenerek MTT testi için uygun hücreler belirlenecektir. 96 kuyulu düz tabanlı hücre kültür kaplarına 100 µL medyum + hücre olacak şekilde ilave edilip 24 saat 37 °C'de ve %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakılacaktır.

24 saat sonrasında yüzeye yapışan hücreler laktik asit bakterilerinden elde edilen ekzopolisakkaritler ile 24, 48 ve 72 saat sürelerinde muamele edilmiştir. Her bir süre sonunda medyum uzaklaştırılarak hücreler 5 mg/mL MTT solüsyonu ile 2 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında MTT solüsyonu uzaklaştırılacak ve canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözünmesi ve reaksiyonun durması için her bir kuyucuğa 0,1 ml DMSO ilave edilmiştir. Son olarak plaklar mikroparka okuyucuda 570 nm dalga boyunda okutulmuştur. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılık oranı %100 olarak kabul edilmiştir [126].

4. BULGULAR

Yapılan bu çalışmada 12 adet ticari ve 3 adet ev yapımı olmak üzere toplamda 15 kefir örneğinin fizikokimyasal özellikleri analiz edilmiş olup, ayrıca kefir örneklerinden izole edilen bakteriler fenotipik ve genotipik yöntemlerle analiz edilmiştir. Fenotipik ve genotipik olarak doğrulan ve en iyi probiyotik özellik gösteren laktik asit bakterilerinden elde edilen ekzopolisakkaritlerin kolon karsinoma hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktivitesi analiz edilmiştir.

4.1. Fizikokimyasal Özellikler

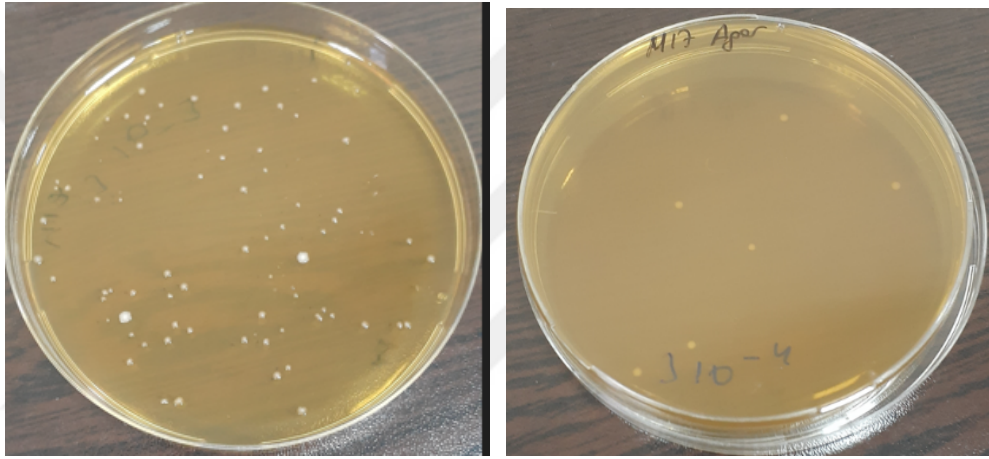
Kefir örneklerinin fizikokimyasal analiz sonuçları en yüksek, en düşük ve ortalama değer olarak Tablo 4.1.'de verilmiştir. Örneklerin pH, toplam asitlik, kuru madde, kül analizlerine ait en yüksek, en düşük ve ortalama değerleri sırasıyla 3,91-4,52, 0,65-1,69, 8,94-16,79, 0,42-1,27; $4,29 \pm 0,14$, $0,83 \pm 0,24$, $12,90 \pm 2,55$, $0,70 \pm 0,21$ olarak belirlenmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Kefir örneklerinin fizikokimyasal analiz sonuçları

Analizler	Ortalama $\pm$ Std. sap.	En düşük	En yüksek	Significance
pH	$4,29 \pm 0,14$	3,91	4,52	0,12
Titrasyon asitliği	$0,83 \pm 0,24$	0,65	1,69	0,00
(% Laktik asit)				
Kül miktarı	$0,70 \pm 0,21$	0,42	1,27	0,02
Kuru madde (%)	$12,90 \pm 2,55$	8,94	16,79	0,28

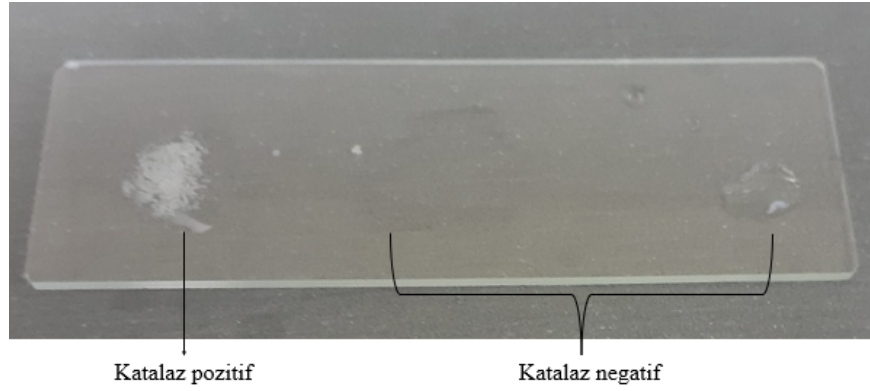
4.2. Laktik Asit Bakterilerinin Saflaştırılması ve Muhafazası

Kefir örneklerinden hazırlanan farklı dilüsyonlar laktik asit bakterileri için MRS agara, laktokoklar için M17 agara klasik kültür yöntemiyle ekimler yapılmış ve inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon sonucunda besiyer üzerinde üreyen ve tipik koloni morfolojisi bakımından (küçük, mat, opak ya da krem renkli) laktik asit bakterisine benzeyen kolonilerden rastgele 3-5 koloni alınarak şüpheli laktik asit bakterisi olarak tanımlanmıştır (Resim 4.1).



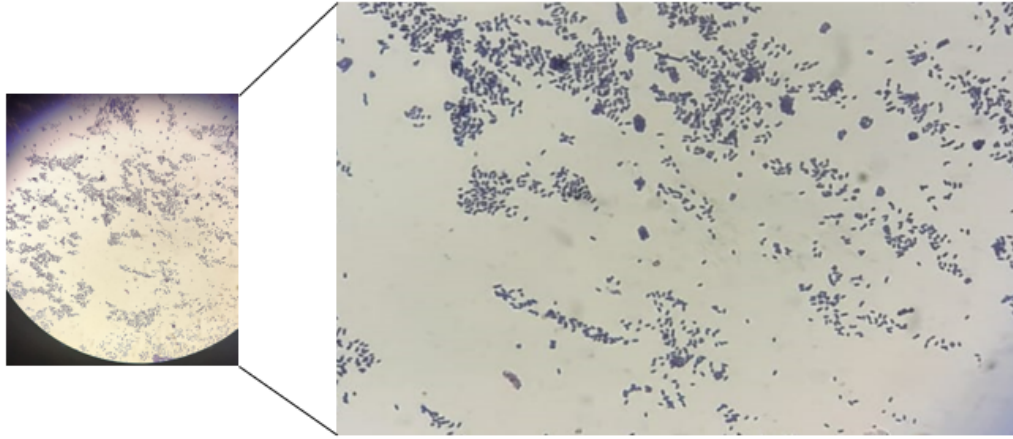
Resim 4.1. Laktik asit bakterileri kolonileri

Bu şüpheli örnekler katalaz testi ve Gram boyama yapılmıştır. Katalaz negatif (Resim 4.2), Gram pozitif (Resim 4.3) izolatlar saklama besiyerine alınarak -20°C’de daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere stoklanmıştır.



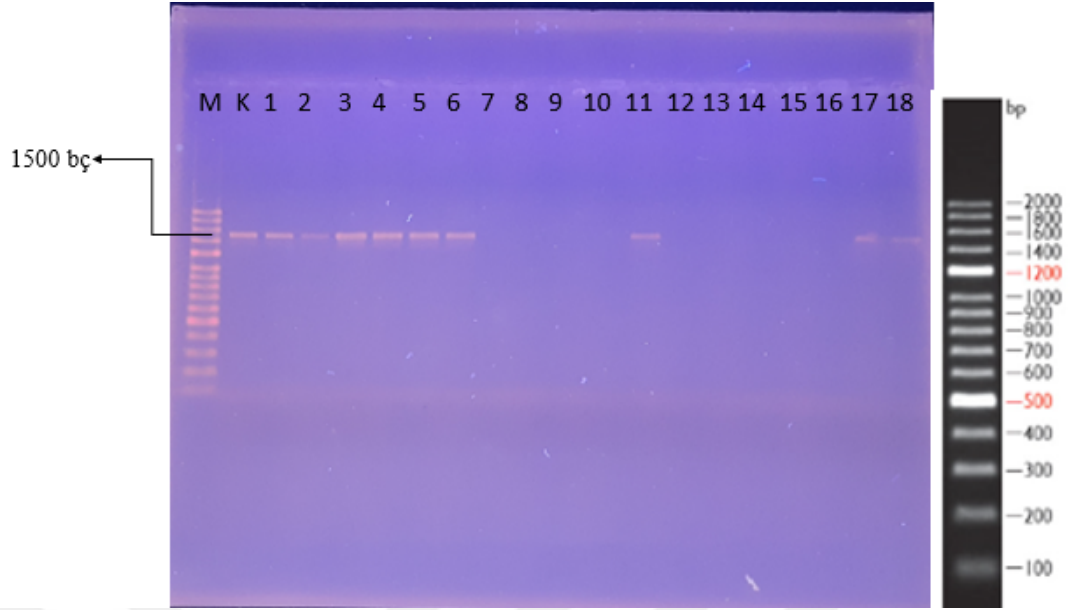
Resim 4.2. Katalaz testi

Katalaz testi sonucunda, gaz çıkışı olmayan yani katalaz negatif izolatlar çalışmaya dahil edilmiştir.



Resim 4.3. Gram boyama sonucunda Gram pozitif izolatların morfolojileri (40x)

Yapılan fenotipik testler sonucunda (koloni morfolojisi, katalaz negatif ve Gram pozitif) toplamda 142 izolat elde edilmiştir. Bu izolatlara bakterilerde korunmuş gen bölgesi olan 16S rRNA gen bölgesini belirlemek için PZR yapılmıştır



Resim 4.4. Laktik asit bakterilerinin jel elektroforez görüntüsü(M: Marker,100 bp;K: Kontrol olarak kullanılan *Lactobacillus plantarum* ATCC®8014; 1, 2, 318: Kefir izolatları)

PZR sonucunda toplamda 37 izolat 1500 bp bölgesinde bant verdiği gözlemlenmiştir pozitif olarak belirlenmiştir. Bundan sonra yapılacak olan laktik asit bakterilerinin probiyotik özelliklerinin belirlenmesine yönelik çalışmalara bu 37 izolatla devam edilmiştir.

4.3. Kefir Örneklerinin Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi

Fenotipik ve genotipik olarak laktik asit bakterisi olarak doğrulanan izolatların (n = 37) probiyotik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla farklı sıcaklık, pH, tuz ve TSI agarda gelişimleri incelenmiştir.

4.3.1. Laktik asit bakterilerinin farklı sıcaklıklarda gelişim

Genotipik olarak laktik asit bakterisi olarak belirlenen 37 izolattan hiçbiri +4°C’de gelişim göstermemiştir. 21 izolat 15°C’de, 19 izolat 45°C’de gelişim göstermiştir. İzolatlardan 7 tanesi (Y13, Y113, Y145, Y142, Y141, Y124, Y121) hem 15°C’de hem de 45°C’de gelişim göstermiştir (Tablo 4.2).

4.3.2. Laktik asit bakterilerinin farklı tuz konsantrasyonlarında gelişim

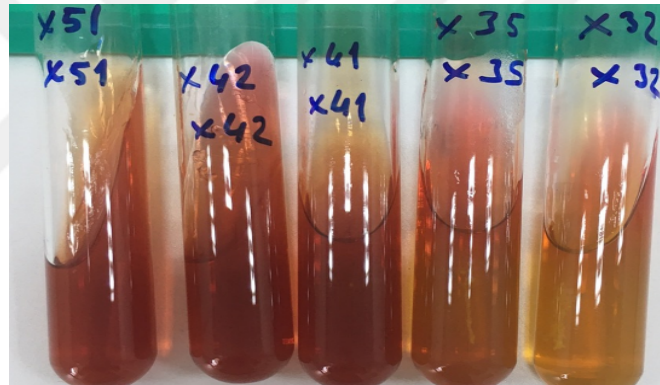
37 adet laktik asit bakteri izolatının hiçbirinin %6, %7,5 ve %10 tuz konsantrasyonlarında gelişim göstermediği tespit edilmiştir (Tablo 4.2).

4.3.3. Laktik asit bakterilerinin farklı pH derecelerinde gelişimi

37 adet izolattan pH 4’de 3 tane, pH 10’da 6 tane izolat gelişim gösterirken, pH 7’de tüm bakteriler gelişim göstermiştir (Tablo 4.2).

4.3.4. Laktik asit bakterilerinin TSI agarda gelişimleri

37 adet izolattan 23’ünün şekeri kullanabilme özelliğine sahip olduğu belirlenmiştir. Hiçbir tüpte gaz oluşumu ve siyahlık gözlenmemiştir (Tablo 4.2, Resim 4.5).



Resim 4.5. Laktik asit bakterilerinin TSI agarda gelişimi

Tablo 4. 2. Laktik asit bakterilerinin mikrobiyolojik özellikleri

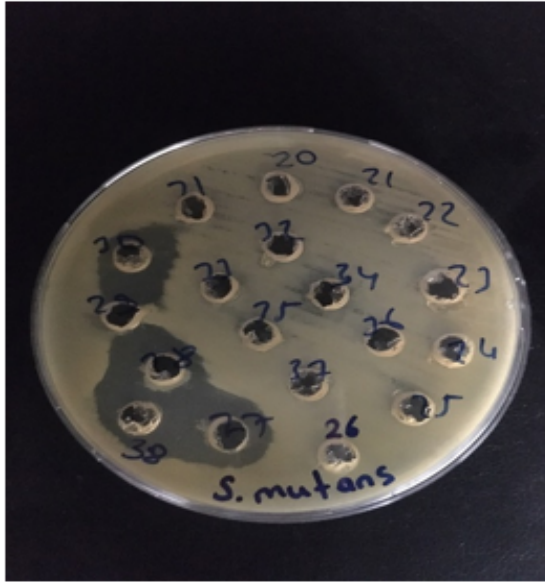
		Sıcaklık			Tuz						pH						TSI	
					MRS BROTH			M17 BROTH			MRS BROTH			M17 BROTH			Dip	Üst
	Örnek	4	15	45	%6	%7,5	%10	%6	%7,5	%10	4	7	10	4	7	10		
1	X32	-	+	-	-	-	-				-	+	+				sarı	kırmızı
2	X35	-	+	-	-	-	-				-	+	+				sarı	kırmızı
3	X41	-	+	-	-	-	-				-	+	-				kırmızı	kırmızı
4	X42	-	-	-	-	-	-				-	+	-				kırmızı	kırmızı
5	X51	-	+	-	-	-	-				+	+	-				kırmızı	kırmızı
6	X54	-	+	-	-	-	-				+	+	-				kırmızı	kırmızı
7	X55	-	+	-	-	-	-				+	+	-				kırmızı	kırmızı
8	Y11	-	+	-				-	-	-				-	+	+	sarı	sarı
9	Y12	-	-	+				-	-	-				-	+	-	sarı	sarı
10	Y13	-	+	+				-	-	-				-	+	+	sarı	kırmızı
11	Y14	-	-	+				-	-	-				-	+	-	sarı	kırmızı
12	Y15	-	-	+				-	-	-				-	+	-	kırmızı	kırmızı
13	Y22	-	-	-				-	-	-				-	+	-	kırmızı	kırmızı
14	Y23	-	-	+				-	-	-				-	+	-	sarı	kırmızı
15	Y24	-	-	+				-	-	-				-	+	-	sarı	kırmızı

Tablo 4.2.'nin devamı

16	Y25	-	-	-				-	-	-				-	+	-	kırmızı	kırmızı
17	Y35	-	+	-				-	-	-				-	+	+	sarı	kırmızı
18	Y115	-	+	-				-	-	-				-	+	-	sarı	kırmızı
19	Y114	-	-	+				-	-	-				-	+	-	kırmızı	kırmızı
20	Y113	-	+	+				-	-	-				-	+	-	sarı	kırmızı
21	Y112	-	-	+				-	-	-				-	+	-	sarı	kırmızı
22	Y111	-	-	+				-	-	-				-	+	-	sarı	kırmızı
23	Y21	-	+	-				-	-	-				-	+	+	sarı	kırmızı
24	Y53	-	+	-				-	-	-				-	+	-	kırmızı	kırmızı
25	Y51	-	-	-				-	-	-				-	+	-	kırmızı	kırmızı
26	Y54	-	+	-				-	-	-				-	+	-	kırmızı	kırmızı
27	Y55	-	+	-				-	-	-				-	+	-	kırmızı	kırmızı
28	Y145	-	+	+				-	-	-				-	+	+	sarı	sarı
29	Y143	-	-	+				-	-	-				-	+	+	sarı	sarı
30	Y142	-	+	+				-	-	-				-	+	+	sarı	sarı
31	Y141	-	+	+				-	-	-				-	+	+	sarı	sarı
32	Y125	-	-	+				-	-	-				-	+	-	sarı	sarı
33	Y124	-	+	+				-	-	-				-	+	-	sarı	sarı
34	Y123	-	-	+				-	-	-				-	+	+	kırmızı	kırmızı
35	Y122	-	-	+				-	-	-				-	+	-	sarı	sarı
36	Y121	-	+	+				-	-	-				-	+	-	sarı	kırmızı
37	Y52	-	+	-				-	-	-				-	+	-	kırmızı	kırmızı

4.5. Bakteriyosin Üretimini Belirlenmesi ve Antibakteriyel Aktivite Testleri

Yapılan bu çalışmada genotipik olarak doğrulan 37 laktik asit bakterisinden bakteriyosin elde edilmiştir. Elde edilen bakteriyosin 0,22 µm çapındaki enjektör filtrelerinden geçirilerek steril edilmiştir. *Staphylococcus aureus* ATCC®25923, *Bacillus cereus* ATCC®7064, *Bacillus subtilis* ATCC®6633, *Streptococcus mutans* ATCC®35668, *Escherichia coli* ATCC®25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC®700603 ve *Salmonella enteritidis* ATCC®13076 patojen bakterileri üzerinde antimikrobiyal aktivite özellikleri kuyu difüzyon yöntemi ile test edilmiştir. Sonuç olarak sadece *S. mutans* üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip 3 izolat test edilmiştir (Resim4.6.)



<u>Difüzyon</u>		<u>İzolat numaraları</u>
<u>testindeki</u>		
<u>numaralar</u>		
27	→	X51
28	→	X55
30	→	Y54
38	→	<i>L. plantarum</i> ATCC®8014

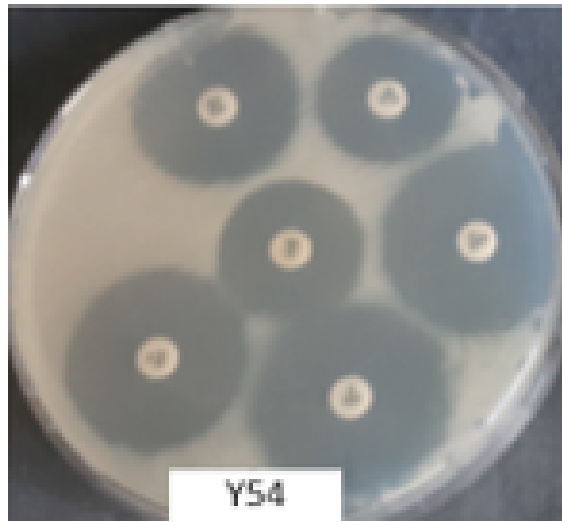
Resim 4.6. Bakteriyosin pozitif izolatlar

Kuyu difüzyon testi sonucuna göre, izolatlardan sadece 3'ünün (X51, X55 ve Y54) *S. mutans* üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip belirlenmiştir. Probiyotik olarak kullanılması gereken izolatların önemli özelliklerinden biri de patojen bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olmasıdır. Bu sebeple çalışmanın bundan sonraki kısmına probiyotik özellik gösterdiği düşünülen bu 3 izolatla devam edilmiştir.

4.6. Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Kirby - Bauer Disk Difüzyon Yöntemine göre yapılan antibiyotik duyarlılık testi sonucuna göre ampisilin, gentamisin, metisilin, penisilin, trimetoprim / sülfametoksazol ve vankomisin olmak üzere toplam 6 antibiyotik test edilmiştir. Disk difüzyon testi sonucuna göre 3 izolatında belirtilen antibiyotiklere karşı duyarlı olarak tespit edilmiştir (Resim 4.7). Bu durum ise laktik asit bakterilerinin probiyotik özellik taşımasındaki önemli bir kriter olduğunu göstermektedir. Çünkü probiyotik özellikte olarak kullanılan bakterilerin aktarılabilir direnç genlerinin olmaması yani antibiyotik dirençliliğin yayılmaması için stabil olması gereklidir.

Disk difüzyon testi 3 kez tekrarlanmıştır. Sonuçlar kumpas yardımıyla ölçülerek mean $\pm$ standart sapma değerleri Tablo 4.3'de belirtilmiştir.



Resim 4.7. Laktik asit bakterilerinin antibiyotik duyarlılık sonuçları

Tablo 4.3. Laktik asit bakterilerinin antibiyotik duyarlılık sonuçları (mm, mean $\pm$ std.sap.)

Bakteri Antibiyotik	<i>L. plantarum</i> ATCC®8014	X51	X55	Y54
AMP	27,00 $\pm$ 1,00	21,66 $\pm$ 2,08	23,66 $\pm$ 1,15	25,00 $\pm$ 0,00
CN	24,00 $\pm$ 1,73	23,33 $\pm$ 0,57	18,33 $\pm$ 2,30	21,66 $\pm$ 0,57
ME	27,00 $\pm$ 1,52	24,66 $\pm$ 1,52	16,66 $\pm$ 2,08	23,33 $\pm$ 1,15
P	30,33 $\pm$ 1,52	32,66 $\pm$,51	17,66 $\pm$ 1,52	22,33 $\pm$ 1,52
STX	30,66 $\pm$ 1,15	24,66 $\pm$ 0,57	19,00 $\pm$ 1,00	25,66 $\pm$ 0,57
V	27,00 $\pm$ 0,00	16,66 $\pm$ 1,52	22,66 $\pm$ 2,08	22,00 $\pm$ 0,00

AMP: Ampisilin, CN: Gentamisin, ME: Metisilin, P: Penisilin, STX: trimetoprim / sülfametoksazol, V: Vankomisin

Tablo 4.3'den görüldüğü gibi izolatlar çalışmada test edilen antibiyotiklere duyarlıdır. Özellikle Y54 nolu izolatın ampisilin 25.00 $\pm$ 0.00 ve trimetoprim/sülfametoksazole 25.66 $\pm$ 0.57 karşı en yüksek oranda duyarlı olduğu görülmüştür.

4.7. Otoagregasyon Testi

Otoagregasyon testi sonucunda izolatlar PBS içerisinde 0.5 McFarlanda ayarlanmış ve yapılan inceleme sonucunda 3 örneğinde agregasyon yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir.

4.8. Sekans Sonuçları

Sekans sonucunda her iki primer okuması sonucunda elde edilen sekanslar BioEdit programı ile birleştirilmiştir.

NCBINuclotideBLAST(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) programı kullanılarak Gen bankasında en yakın ilişkili tür belirlenmiş ve Tablo 4.4'te belirtilmiştir.

Tablo 4.4. Sekans sonucunda gen bankası ile ilişkili yakın türler

İzolat Kodu	Gen Bankası Yakın İlişkili Tür	% Benzerlik	Uzunluk (bp)	Gen Bankası Numarası
X55	<i>Acetobacter fabarum</i> strain 2567 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100	1244	MT611597.1
Y54	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain PN165 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100	952	OP714486.1
X51	<i>Acetobacter fabarum</i> strain 2567 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100	1202	MT611597.1

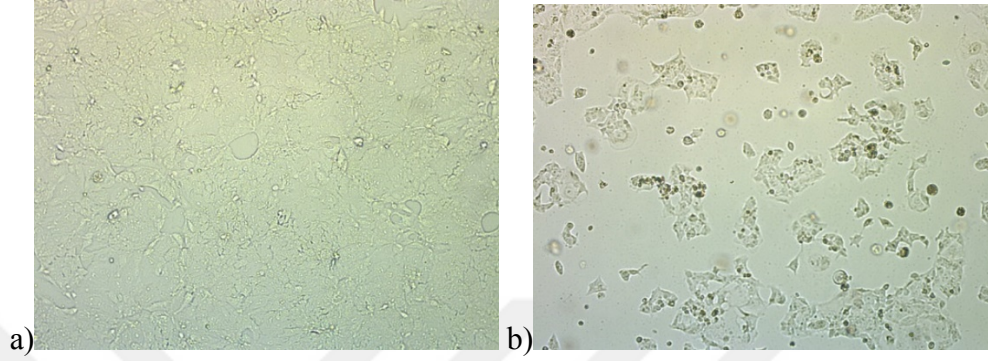
16S rRNA gen bölgesine ait sekans analizi sonucunda elde edilen izolatların *Acetobacter fabarum* (X51 ve X55) ve *Leuconostoc mesenteroides* (Y54) ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Filogenetik ağaç oluşturmak için tip türlere ait sekanslar List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN)'den elde edilmiştir. X51 ve X55 kodlu izolatlar ve *Acetobacter* sp. cinsine ait sekanslarla, Y54 kodlu izolat ise *Lactobacillus* sp. ve *Leuconostoc* sp. cinsi üyelerine ait sekanslarla hizalandıktan (CLUSTALW) sonra filogenetik ağaç MEGA11 programında Neighbor-Joining ve Maximum Likelihood algoritmaları ile çizilmiştir (Ek-1 ve Ek-2).

16S rRNA sekans analizine paralel olarak Ek-1'de Neighbor Joining filogenetik ağaçlarında X51 ve X55 kodlu izolatlar *Acetobacter fabarum* ile aynı dalda kümelenirken, Y54 kodlu izolat ise *Leuconostoc mesenteroides* ssp. üyeleri ile aynı dalda kümelenmiştir. Neighbor Joining ve Maximum Likelihood ağaçları birbirini desteklemektedir.

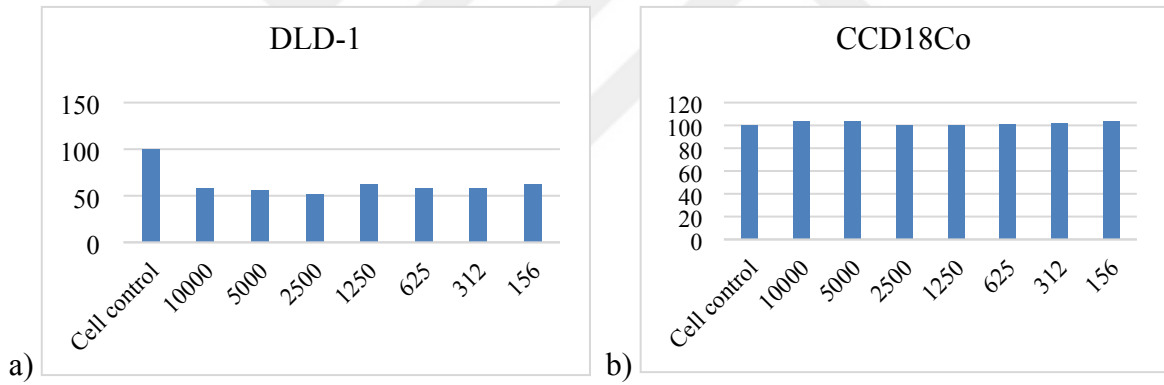
4.9. Ekzopolisakkarit Üretimi ve Sitotoksikite Testleri

Probiyotik özellikteki bir laktik asit bakterisi olan *L. mesenteroides*'den (Y54 nolu izolat) elde edilen ekzopolisakkaritin kolon karsinoma hücre hattı üzerinde sitotoksik aktivitesi MTT testi ile analiz edilmiştir. MTT hücre canlılık testi olarak bilinen bir testtir ve mitokondriyal aktivite testi olarak da bilinir. Hücreler 10000 - 156 μ M konsantrasyonda ekzopolisakkarite 24, 48 ve 72 saat süre ile maruz bırakılmıştır. Maruziyet sonrasında IC₅₀ (inhibisyonun %50 sini öldüren değer) belirlenmiştir. Fotoğraf 4.8 ve Şekil 4.1'den anlaşıldığı gibi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücreler IC₅₀ değerinde tutunma özelliklerini kaybettiği belirlenmiştir. Ekzopolisakkarit ve DLD-1 kolon karsinoma hücre

hatının en iyi sitotoksik dozu 24 saatlik maruziyeti sonucu elde edilmiş ve IC_{50} değeri 50 μ M olarak belirlenmiştir.



Resim 4.8. DLD-1 kolon karsinoma hattı inverted mikroskop (x20) a) Kontrol grubu hücre, b) Y54'e ait ekzopolisakkarit uygulanan hücre morfolojisi



Şekil 4.1. *L. mesenteroides*'den elde edilen ekzopolisakkaritin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi, a) DLD-1 hücre hattı, b) CCD18Co hücre hattı

Ayrıca CCD18Co hücre hattı 24, 48 ve 72 saat *L. mesenteroides*'den elde edilen ekzopolisakkarite maruz bırakılmış fakat bir sitotoksik etki göstermediği görülmüştür. Hücreler kontrol grubu ile aynı oranda gelişim göstermişlerdir (Şekil 4.1).

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda incelenen kefir örneklerinin pH, toplam asitlik, kuru madde, kül analizlerine ait en yüksek, en düşük ve ortalama değerleri sırasıyla 3,91-4,52, 0,65-1,69, 8,94-16,79; $0,42-1,27$; $4,29 \pm 0,14$, $0,83 \pm 0,24$, $12,90 \pm 2,55$, $0,70 \pm 0,21$ olarak belirlenmiştir.

Ankara’da yapılan bir çalışmada piyasadaki sade, meyveli ve diyet kefir örnekleri incelenmiş pH değerleri en düşük 4.58, en yüksek 4.74 olarak bulunmuştur [127]. Arjantin’de farklı kaynaklardan elde edilen 4 farklı kefir örneğinin pH değerleri ise sırasıyla 3,71; 3,69; 3,76; 3,83 olarak [128]; İran’da farklı inkübasyon sürelerinde (12, 24, 36, 60 ve 72) üretilen 5 farklı kefir örneğinin pH değerleri ise sırasıyla 4,00; 3,89; 3,01; 3,00; 2,98 olarak bulunmuştur [129]. Endonezya’da inek sütü ve keçi sütü kullanılarak üretilen kefirler incelenmiş; inek sütü ile mayalanan kefir örneğinin pH değeri ortalama $3,89 \pm 0,15$; keçi sütü ile mayalanan kefir örneğinin pH değeri ise ortalama $3,55 \pm 0,09$ bulunmuştur [130]. Lengkey ve ark (2013) %5, %10, %15, %20, %25 oranlarında kültürler kullanılarak mayalanan kefir örneklerini incelemiş ve ortalama pH değerlerini sırasıyla 4,40; 3,95; 3,75; 3,60 ve 3,50 olarak bulmuşlardır. [131]. Hagh (2018) tarafından farklı sütlerden (inek, manda, keçi, deve) yapılan kefir örneklerinde deve, inek, manda, keçi sütlerinin sırasıyla pH değerleri 6,7; 6,8; 6,83; 6,74 bulunmuştur. [132].

Öksüztepe [133] tarafından Elazığ’da yapılan çalışmada; sade, meyveli ve light kefir örnekleri incelenmiş; asitlik değeri sade, meyveli ve light kefirlerde sırasıyla ortalama $0,74 \pm 0,04$; $0,73 \pm 0,09$; $0,81 \pm 0,05$ Hagh (2018) tarafından $0,16-0,19$ [132]; Ünal ve ark (2020) tarafından ise en yüksek 0,88; en düşük 0,67 ortalama $0,82$ olarak belirlemiştir [132]. Öksüztepe ve ark. [133] tarafından kefir örneklerinin kuru madde miktarları sırasıyla ortalama $10,00 \pm 0,84$; $13,74 \pm 1,43$; $7,90 \pm 0,14$; Ünal ve ark. [110] tarafından en yüksek 10,68; en düşük 8,71; ortalama 9,67 bulunmuştur. Çalışma sonuçlarımız literatürdeki diğer çalışmalarla benzer sonuçlar vermiştir. Fakat Ak [134] tarafından yapılan bir çalışmada çilek, frambuaz, şeftali aromalı kefirlerin fizikokimyasal özellikleri incelenmiş ortalama titrasyon asitlik değeri en fazla çilekli kefirde ($1,27 \pm 0,29$) en az titrasyon asitlik değeri ise şeftalili kefirde ortalama ($1,20 \pm 0,27$) bulunmuştur. Kuru madde miktarları ise çilek, frambuaz, şeftali aromalı kefirlerde sırasıyla ortalama $25,13 \pm 1,20$; $25,45 \pm 1,04$; $25,22 \pm 1,07$ bulunmuştur. Asitlik ve kuru madde miktarındaki bu farklılıkların kefir örneklerinde kullanılan meyve çeşidine bağlı değişiklik gösterebileceği düşünülmektedir.

Akdan ve ark; [135] manda, manda-inek, manda-koyun, manda-keçi, manda-inek-koyun-keçi kombinasyonlarının oluşturduğu karışımları incelemiş toplam kül miktarını sırasıyla $0,75\pm0,01$; $0,82\pm0,02$; $0,90\pm0,07$; $0,74\pm0,04$; $0,98\pm0,04$ bulmuşlardır. Kök-Taş ve ark (2014) ise 3 farklı kefir örneğinin kül miktarlarını $0,55\pm0,05$; $0,64\pm0,11$; $0,66\pm0,02$ olarak bulmuştur [136].

Çalışma sonuçlarımız literatürdeki diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında genel olarak benzer fizikokimyasal özelliklere sahip ve standartlara uygun olduğu fakat kullanılan sütün cinsi, kullanılan mayanın cinsi ve miktarı, mayalanma süresi ve sıcaklığı, örneklerle karıştırılan meyveler gibi birçok parametreye bağlı olarak farklılıklar görülebileceği tespit edilmiştir.

Yapılan fenotipik testler sonucunda (koloni morfolojisi, katalaz testi, gram boyama) standartlara uygun olduğu düşünülen toplam 142 izolat elde edilmiştir. Bu 142 izolata bakterilerde korunmuş gen bölgesi olan 16S rRNA gen bölgesini belirlemek için PZR yapılmış ve 1500 bç bölgesinde bant verdiği gözlemlenen 37 izolat tespit edilmiştir. Laktik asit bakterilerinin probiyotik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar tespit edilen 37 izolat üzerinden yürütülmüştür.

Probiyotik bir suş elde etmenin ilk adımı örnekten bakterilerin izolasyonu ve seçilen izolatların farklı kültür ve ortamlardaki karakterizasyonu ile olmaktadır [116]. Çalışmamızda Laktik Asit Bakterileri'nin farklı sıcaklıklarda, farklı tuz konsantrasyonlarında, farklı pH değerlerinde, şekeri kullanabilip kullanamama özelliklerine, bakteriyosin üretimi, antibakteriyel aktiviteleri, antibiyotik duyarlılıklarına göre incelenerek probiyotik özellik gösteren izolatlar tespit edilmiştir.

Çalışmamızda genotipik olarak laktik asit bakterisi olarak belirlenen 37 izolatın, 4 °C, 15 °C ve 45°C değerlerindeki gelişmeleri gözlemlenmiş izolatların hiçbirisi +4°C'de gelişim göstermemiştir. 21 izolat 15°C'de, 19 izolat 45°C'de; 7 tanesi ise hem 15°C'de hem de 45°C'de gelişim göstermiştir.

Ertekin ve Çon [137] yaptıkları çalışmada inceledikleri tüm izolatların 15°C'de gelişebildiğini; sadece *P. Pentosaceus* izolatları ile *L.plantarum* izolatının 45°C'de gelişebildiğini ve laktobasillerin çoğunun 10 °C'de gelişebildiğini belirtmiştir. Tereyağından elde edilen laktik asit bakterilerden alınan 7 izolatın incelendiği çalışmada ise tamamına yakınının 15 °C, 30 °C ve 45 °C'de gelişim gösterdiği 2 tanesinin ise 15°C'de 1 tanesinin ise 45 °C'de gelişme göstermediği tespit edilmiştir [138].

Çalışmamızda kullanılan 37 izolatın hiçbirinin %6, %7,5 ve %10 tuz konsantrasyonlarında gelişim göstermediği tespit edilirken Kılıç ve arkadaşları [138] tarafından yapılan araştırmada incelenen 7 izolatın %2 ve %6 tuz konsantrasyonlarında iyi gelişme gösterdiği; %10 tuz konsantrasyonunda ise gelişme gösteremediği belirlenmiştir. Tangüler ve Erten [139] ise incelediği 47 laktik asit bakteri izolatının 37 tanesinin %6.5 tuz konsantrasyonunda gelişebildiği; %18 tuz yoğunluğunda ise hiçbir izolatın gelişme gösteremediğini belirtmişlerdir.

37 adet izolatımızın 3 tanesi pH 4'te, 6 tanesi Ph 10'da, ve tamamı pH 7 de gelişim göstermiştir. Turşudan elde edilen laktik asit bakterilerinin 39 izolatu incelenmiş 8 tanesi pH 3 değerinde, 29 tanesi pH 4 değerinde, 1 tanesi ise pH 3 ve pH 4 değerinde gelişme göstermiştir [140]. Sirke ve yoğurt altı suyu kullanılarak üretilmiş iki farklı turşu türünden elde edilen izolatlardan 8 tanesinin pH 3 değerinde; 46 tanesinin pH 4,5 değerinde gelişme gösterdiği; pH 9,5 değerinde ise hiçbir izolatın gelişme göstermediği tespit edilmiştir [141].

Bir mikroorganizmanın bakteriyosin üretebilmesi ve antimikrobiyal özellik gösterebilmesi, probiyotik olarak seçilmesinin en önemli kriterlerinden birisidir. Çalışmamızda 37 adet izolattan bakteriyosin elde edilmiş ve *Staphylococcus aureus* ATCC®25923, *Bacillus cereus* ATCC®7064, *Bacillus subtilis* ATCC®6633, *Streptococcus mutans* ATCC®35668, *Escherichia coli* ATCC®25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC®700603 ve *Salmonella enteritidis* ATCC®13076 patojen bakterileri üzerinde antimikrobiyal aktivite özellikleri kuyu difüzyon yöntemi ile test edilmiştir. Sonuç olarak sadece *S. mutans* üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip 3 izolat tespit edilmiştir.

Purutoğlu ve ark. (2020) incelediği 27 LAB izolatının *S. typhimurium*, *E. coli*, *B. cereus*, *Y. enterocolitica* ve *S. aureus* 'a karşı antibakteriyel aktivitelerinin *E. coli*, *B. cereus*, *Y. Enterocolitica* 'ya karşı daha fazla etkili iken, *S. typhimurium* ve *S. aureus* 'a karşı daha az inhibitör etki gösterdiğini [114]; Angelescu ve ark (2019) incelediği iki farklı fermente içecekten 7 *Lactobacillus* türüne ait sekiz izolattan 5 tanesi *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella enterica* dahil olmak üzere patojenik bakterilere karşı antibakteriyel aktivite gösterdiğini [142] Erdoğan ve Bostancı (2020) ise incelediği 6 laktik asit bakterisinin antimikrobiyal aktivite test sonuçlarına göre; elde edilen LAB izolatları, en çok *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* üzerinde antimikrobiyel etki gösterdiğini belirtmişlerdir [62].

Antimikrobiyal aktivite gösteren 3 izolatın antibiyotik duyarlılıkları ölçüldüğünde 3 izolatın da ampisilin, gentamisin, metisilin, penisilin, trimetoprim / sülfametoksazol ve vankomisin'e karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. İran'da 96 farklı geleneksel yoğurt örneğinden 47 Laktik Asit Bakterisi izole edilerek probiyotik potansiyeli olan 12 izolat incelendiğinde tüm izolatların vankomisin ve streptomisin'e dirençli, klindomisin, eritromisin ve gentamisine duyarlı olduğu bulunmuştur [143]. Güney Hindistan'da ev yapımı lordan izole edilen 15 laktik asit bakteri türünün antimikrobiyal aktiviteleri ve antibiyotik dirençleri incelenmiş 14 suş *S. Typhimurium*'a karşı, 5 suş *V. cholerae* 0139'a karşı 1 suş, *E. coli*'ye ve 1 suş *Shigella*'ya karşı inhibe edici özellik göstermiş; tüm suşlar, vankomisin, norfloksasin, ampisilin, kloramfenikol, gentamisin, rifampisin, tetrasiklin'e karşı dirençli olarak bulunmuştur [144]. Turhan ve Enginkaya (2016) izole edilen 5 adet Laktik Asit Bakterisi'nin vankomisin tetrasiklin ampisilin gentamisin ve siprofloksasine karşı dirençli; eritromisin kloramfenikol ve nitrofurantoin duyarlı olduklarını bulmuştur [145]. Probiyotik özellik gösteren bakterilerin antibiyotik direnç genlerine sahip olması, bu genlerin aktararak patojen bakterilere transfer edilmesine sebebiyet vermekte ve hastalıkların tedavisine katkıda bulunmak yerine engelleyici etki gösterebilmektedir. Bu sebeple probiyotik özellik gösteren bir bakterinin antibiyotiklere duyarlı olması gerektiği çalışmamız sonuçları ve literatürdeki diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Probiyotik bir bakteriye sahip tüm koşulları sağlayan 3 izolat; NCBI Nucleotide BLAST programı kullanılarak en yakın ilişkili tür belirlenmiş iki izolatın *Acetobacter fabarum* (X55, X51) olduğu tespit edilmiştir. Bir izolatın (Y54) ise probiyotik grupta incelenen bir bakteri olan *Leuconostoc mesenteroides* (*L. mesenteroides*) olduğu belirlenmiştir.

Probiyotik özellikteki bir laktik asit bakterisi olan *L. mesenteroides*'den (Y54 nolu izolat) elde edilen ekzopolisakkaritin kolon karsinoma hücre hattı üzerinde; 10000 - 156 µM konsantrasyonda ekzopolisakkarite 24, 48 ve 72 saat süre ile maruz bırakılarak en iyi sitotoksik dozu 24 saatlik maruziyeti sonucu elde edilmiş ve IC50 değeri 2500 µM olarak belirlenmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada 3 tanesi ev yapımı olmak üzere toplam 15 adet kefir örneği toplanmıştır. Bu kefirlerden laktik asit bakteri izolasyonu yapılmış ve bu izolatlardan muhtemel laktik asit bakterisi olduğu düşünülen 37 adet bakteri kullanılmıştır. Bu bakterilerden bakteriyosin üretme yetenekleri tespit edilmiş, ekzopolisakkarit elde edilerek insan kolon kanseri hücresi üzerindeki sitotoksik aktivitesine bakılmış ve bazı teknolojik özellikleri belirlenmiştir. Yapılan tüm bu çalışmalar özetlendiğinde;

Kefir örneklerinin pH, toplam asitlik, kuru madde, kül analizlerine ait en yüksek, en düşük ve ortalama değerleri, titrasyon asitliği; literatürdeki diğer çalışmalarla benzer sonuçlar göstermiş olup Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği'ne göre uygun bulunmuştur.

Yapılan fenotipik analizler sonucunda 142 izolat belirlenmiş; 142 izolatın 16S rRNA gen bölgesini belirlemek için PZR yapılarak 1500 bp bölgesinde bant verdiği gözlemlenen 37 izolat tespit edilmiştir.

Fenotipik ve genotipik olarak laktik asit bakterisi olduğu doğrulanan 37 izolatın probiyotik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla farklı sıcaklık, pH, tuz ve TSI agarda gelişimleri incelenmiştir.

Genotipik olarak doğrulanan 37 laktik asit bakterisinden bakteriyosin elde edilerek;

Staphylococcus aureus, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* patojen bakterileri üzerinde antimikrobiyal aktivite özellikleri kuyu difüzyon yöntemi ile test edilmiş; 3 izolatın (X51, X55, Y54) *Streptococcus mutans* üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Bakterilerin antibiyotiklere duyarlı olması ve aktarılabiliir direnç genlerine sahip olmaması laktik asit bakterilerinin probiyotik özellik taşımasındaki önemli bir kriter olması sebebiyle Ampisilin, gentamisin, metisilin, penisilin, trimetoprim / sülfametoksazol ve vankomisin olmak üzere 6 antibiyotik üzerinde antibiyotik duyarlılık testleri yapılmış; yapılan testler sonucunda 3 izolatın da antibiyotiklere karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Probiyotik bir bakteride bulunması gereken tüm özellikleri sağlayan 3 izolat NCBI Nucleotide BLAST programı kullanılarak gen bankasında incelenmiş; 2 izolatın *Acetobacter fabarum* olduğu, 1 izolatın ise probiyotik grupta incelenen bir bakteri olan *Leuconostoc mesenteroides* (*L. mesenteroides*) olduğu tespit edilmiştir.

Laktik asit bakterisi olarak tespit edilen izolattak ekzopolisakkarit üretilmiş; kolon karsinoma hücre hattı üzerinde sitotoksik aktivitesi MTT testi ile analiz edilerek IC50 (inhibitör konsantrasyonu, %50 sini öldüren değer) belirlenmiştir. Ekzopolisakkarit ve DLD-1 kolon karsinoma hücre hatının en iyi sitotoksik dozu 24 saatlik maruziyeti sonucu elde edilmiş ve IC50 değeri 2500 µM olarak belirlenmiştir.

Leuconostoc mesenteroides (Y54) 15°C’de ve pH 7’de gelişme göstermesi, çalışmada kullanılan tüm antibiyotiklere duyarlı olması, bu bakterinin gelişim sıcaklığı, pH’sı ve bakteriyosin üretimi, antibiyotik duyarlılığı; starter kültür ve probiyotik olarak kefir üretiminde kullanılmasını desteklemektedir.

Kanser hastalığının kalıcı tedavisinde uygulanan tedavi metodlarına ek olarak alternatif tedavi metodları ile birlikte antikanserojenik özellik gösterebileceği düşünülen fonksiyonel besinler araştırılmıştır. Çalışmamız sonucunda fonksiyonel bir besin olan kefirde elde edilen *Leuconostoc mesenteroides*’in kolon adenokarsinoma hücre hattı (DLD-1) üzerinde inhibe etme özelliğine sahip olduğu tespit edilmiş olup kolon kanseri tedavilerinde yardımcı olarak kullanılabileceği ve bu bağlamda yapılabilecek çalışmalara katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Baysal, A. (2012). *Beslenme*. Ankara, Hatipoğlu.
2. Baysal, A. (1998). Sağlıklı Beslenme: Uzmanların Önerisi Tüketicinin Algılaması. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 27(2), 1-4.
3. Çelebi, Ş., Kaya, H. ve Kaya, A. (2017). Omega-3 Yağ Asitlerinin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. *Alınları Ziraat Bilimler Dergisi*, 32(2), 105-112.
4. Yeşil, E. ve Çelik, A. (2017). Yağ Asitleri ve Antioksidanlar. *Türkiye Klinikleri Cardiol-Special Topics*, 10(4), 274-280.
5. Yılmaz, M. (2004). Prebiyotik ve Probiyotikler. *Güncel pediatri*, 2, 142-145.
6. Başoğlu, M.T. (2014). Probiyotikler. *İzmir Üniversitesi Tıp Dergisi*, 3, 37-40.
7. Kailsapthy, K. and Chin, J. (2000). Survival and Therapeutic Potential of Probiotic Organisms With. Reference to *Lactobacillus acidophilus* and Bifidobacterium spp. *Immunology and cell biology*, 78, 80-88.
8. Sağdıç, O. Küçüköner, E. ve Özçelik, S. (2004). Probiyotik ve prebiyotiklerin fonksiyonel özellikleri. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35(3), 221-228.
9. Özden, A. (2013). Probiyotik “Sağlıklı Yaşam İçin Yararlı Dost Bakteriler”. *Güncel gastroenteroloji*, 17(1), 22-38.
10. Türkiye Gıda Kodeksi, 2006.
11. Say, D., Tangüler, H. ve Güzeler, N. Çilek ve Kayısı Aromalı Kefirlerin Depolanması Sırasında Mikrobiyolojik Özelliklerindeki Değişim. *Academic Platform-Journal of Engineering and Science*, 7(2), 306-311.
12. Tomar, O., Çağlar, A. ve Akarca, G. (2017). Kefir ve Sağlık Açısından Önemi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 17(2), 834-853.
13. Fuller, R. (2004). Reasons for the Apparent Variation in the Probiotic Response. *Biologist*, 51(4), 232.
14. Karacaer, C., Varım, C., Toka, B. Yaylacı, S. ve Genç, A. B. (2017). Bağırsak Mikrobiyotası, Probiyotikler ve İrritable Bağırsak Sendromu (İBS). *Journal of Human Rhythm*, 3(3), 120-125.
15. Taşdemir, A. (2017). Probiyotikler, Prebiyotikler, Sinbiyotikler. *Sağlık Akademisi Kastamonu*, 2(1), 71-88.

16. Koçak, Y. ve Çiftci, A. (2020). Tavuk Kökenli Enterococcus faecium ve Lactobacillus Türlerinin Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması, *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 5(3), 356-365.
17. Yağcı, R. V. (2005). Probiyotik ve Prebiyotikler. *Güncel Gastroenteroloji*, 9(4), 223-225.
18. Seyirt, S. (2022). Ankara'da Satışa Sunulan Probiyotik Gıdalardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençlilik Düzeyinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
19. Zendeboodi, F., Khorshidian, N., Mortazavian, A. M. and da Cruz, A. G. (2020). Probiotic: Conceptualization From a New Approach. *Current Opinion in Food Science*, 32, 103-123.
20. Usta, M. Urgancı, N. (2014). Çocukluk Çağında Probiyotik Kullanımı. *Güncel Pediatri*, 1, 88-94.
21. Yurttaş, M. Yılmaz, A. 2017. Sağlık Yüksekokulu Öğrencilerinin Probiyotik Ürünler Hakkında Bilgi Düzeyinin ve Tüketim Durumunun Belirlenmesi. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 6(2), 64-69.
22. Ewaschuk, J.B. and Dieleman, L.A., 2006. Probiotics and Prebiotics in Chronic Inflammatory Bowel Diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 12(37), 5941-5950.
23. Can, Ö. P. (2007). Probiyotik Mikroorganizmaların Yararları. *Fırat Üniversitesi Doğu Araştırmaları Dergisi*, 5(2), 107-110.
24. Uymaz, B. (2010). Probiyotikler ve Kullanım Alanları. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(1), 95-104.
25. Kıran, F. ve Osmanagaoğlu, Ö. (2012). Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Olarak Kullanımı. *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 26(4), 60-67.
26. Gülbandılar, A. Okur, M., Dönmez, M. (2017). Fonksiyonel Gıda Olarak Kullanılan Probiyotikler ve Özellikleri, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 10 (1), 44-47.
27. Aydın, İ. ve Konuşkan, Z.G. (2022). Effect of Probiotic Microorganisms on Health. *Karya J Health Sci*, 3(2), 161-166.
28. Koçak, Y., Fındık, A. ve Çiftçi, A. (2016). Probiyotikler: Genel Özellikleri ve Güvenilirlikleri. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 27(2), 118-122.
29. Salminen, S. and vonWright A. 1998. Current Probiotics-Safety Assured? *Microbial Ecology in Health and Disease*, 10, 68-77.

30. Ceyhan, N. ve Aliç, H. (2012). Bağırsak Mikroflorası ve Probiyotikler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 1, 107-113.
31. Işıdan, H. (2009). Probiyotikler. *Aquaculture Studies*. 1, 9-12.
32. Çakır, I. ve Çakmakçı, M. L. (2004). Probiyotikler: Tanımı, Etki Mekanizması, Seçim ve Güvenilirlik Kriterleri. *GIDA*, 29(6), 427-434.
33. Doğan, M. (2011). Probiyotik Bakterilerin Etki Mekanizması. *Anadolu Bil Meslek Yüksekokulu Dergisi*, (21), 98-104.
34. Settanni, L. and Corsetti, A. (2008). Application of Bacteriocins in Vegetable Food Biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 121(2), 123-138.
35. Uylaşer, V., Yönel, S. P., ve Savaş, E. (2008). Doğal Antimikrobiyal Bir Bileşik: Bakteriyosin. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, (10).
36. Sulthana, R. and Archer, A. C. (2021). Bacteriocin Nanoconjugates: Boon to Medical and Food Industry. *Journal of Applied Microbiology*, 131(3), 1056-1071.
37. Yalçın, H. ve Üstündağ, H. (2017). Bakteriyosinler ve Gıdalarda Kullanımı. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 5(1), 53-65.
38. Gülgör, G. ve Özçelik, F. (2014). Bakteriyosin Üreten Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Amaçlı Kullanımı. *Akademik Gıda*, 12(1), 63-68.
39. Darbandi, A., Asadi, A., Mahdizade Ari, M., Ohadi, E., Talebi, M., Halaj Zadeh, M., Darb Emamie, A., Ghanavati, R. and Kakanj, M. (2022). Bacteriocins: Properties and Potential Use as Antimicrobials. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(1), 24093.
40. Riley, M. A. and Wertz, J. E. (2002). Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 117-137.
41. Özkalp, B. (2006). *Doğal tip Lactococcus lactis Suşlarının Endüstriyel Starter Kültür Potansiyellerinin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
42. Tiwari, S. K. (2022). Bacteriocin-Producing Probiotic Lactic Acid Bacteria in Controlling Dysbiosis of the Gut Microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 415.
43. Fernandes, A. and Jobby, R. (2022). Bacteriocins From Lactic Acid Bacteria And Their Potential Clinical Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194(10), 4377-4399.

44. Fidan, A., & Uğraş, S. (2022). Bakteriyosinlerin Sağlık Alanında Kullanımı. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 145.
45. Kurt, Ş. ve Zorba, Ö. (2005). Bakteriyosinler ve Gıdalarda Kullanım Olanakları. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16(1), 77-83.
46. Uymaz, B. (2010). Probiyotikler ve Kullanım Alanları. *Pamukkale University Journal of Engineering Sciences*, 16(1).
47. Bilginer, H. ve Çetin B. (2019). Probiyotikler ve Belirlenmelerinde Kullanılan İn Vitro Testler. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 50(3), 312-325.
48. Altunatmaz, S. S., Kahraman, T., ve Aksu, F. Y. (2010). Probiyotik Gıdalar ve İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri. *Anadolu Bil Meslek Yüksekokulu Dergisi*, (19), 90-95.
49. Özden, A. (2008). Diğer Fermente Süt Ürünleri. *Güncel Gastroenteroloji*, 12(3), 169-181.
50. Karaçıl, M. Ş. ve Acar, N. (2013). Dünyada Üretilen Fermente Ürünler: Tarihsel Süreç ve Sağlık İle İlişkileri. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 27(2), 163-174.
51. Milli Eğitim Bakanlığı (2011). Gıda Teknolojisi. Ankara. Milli Eğitim Bakanlığı.
52. Duran, F.E. (2020). *Kefir Danesine Özgü Bazı Bakterilerden ve Daneden Üretilen Ürünlerin Aroma Bileşenlerinin Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
53. Nejati, F., Junne, S., Neubauer, P. (2020). A Big World in Small Grain: A Review of Natural Milk Kefir Starters. *Microorganisms*, 8(2), 192.
54. Yalçın, N. F., & Işık, M. K. (2017). Kefir; Ürün Özellikleri ve İnsan Sağlığına Etkisi. *Adıyaman Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 3(1), 439-452.
55. Leite, A. M. D. O., Miguel, M. A. L., Peixoto, R. S., Rosado, A. S., Silva, J. T. and Paschoalin, V. M. F. (2013). Microbiological, Technological and Therapeutic Properties Of Kefir: A Natural Probiotic Beverage. *Brazilian journal of Microbiology*, 44, 341-349.
56. Fan, D., Stoyanova, L. G. and Netrusov, A. I. (2022). Microbiome and Metabiotic Properties of Kefir Grains and Kefirs Based on Them. *Microbiology*, 91(4), 339-355.

57. Alraddadi, F. A., Ross, T., & Powell, S. M. (2023). Evaluation Of The Microbial Communities In Kefir Grains and Kefir Over Time. *International Dairy Journal*, 136, 105490.
58. Azizi, N. F., Kumar, M. R., Yeap, S. K., Abdullah, J. O., Khalid, M., Omar, A. R., and Alitheen, N. B. (2021). Kefir and Its Biological Activities. *Foods*, 10(6), 1210.
59. Gündüz, G. (2017). Mikrobiyom, Kefir ve Yaşlanma. *Batı Karadeniz Tıp Dergisi*, 1(3), 119-124.
60. Esmek, E. ve Güzeler, N. (2015). Kefir ve Kefir Kullanılarak Yapılan Bazı Ürünler. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 19(4), 250-258.
61. Çiftçi, M., Öncül, N. (2021). Süt Ürünlerinde Starter Kültür Kullanımı, *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi (GBAD)*, 10 (3), 62-76.
62. Rosa, D. D., Dias, M. M., Grzeškowiak, Ł. M., Reis, S. A., Conceição, L. L. and Maria do Carmo, G. P. (2017). Milk Kefir: Nutritional, Microbiological and Health Benefits. *Nutrition Research Reviews*, 30(1), 82-96.
63. Türkiye Gıda Kodeksi, 2009.
64. Farag, M. A., Jomaa, S. A., Abd El-Wahed, A. and R. El-Seedi, H. (2020). The Many Faces Of Kefir Fermented Dairy Products: Quality Characteristics, Flavour Chemistry, Nutritional Value, Health Benefits, and Safety. *Nutrients*, 12(2), 346.
65. Karagözlü, C., ve Kavas, G. (2000). Alkollü Fermente Süt İçecekleri: Kefir Ve Kımızın Özellikleri ve İnsan Beslenmesindeki Önemi. *Gıda*, 6 (7),86-93.
66. Koyu, E. B. ve Büyüktuncer Demirel, Z. (2018). A functional food: Kefir. *J. Nutr. Diet*, 46, 166-175.
67. Koroleva, N.S. (1988). Technology of Kefir and Kumys. *IDF Bulletin*, 227: 96-100.
68. Ürkek, B., Erkaya, T., & Şengül, M. (2012). Kefir: Bileşimi, Üretimi, Probiyotik ve Terapötik Özellikleri. *Akademik Gıda*, 9(5), 60-66.
69. Yelce, S. ve Gül, M. (2020). Antalya İlinde Tüketicilerin Kefir Tüketimi ve Tüketici Davranışları. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 25(3), 316-325.
70. Stiemsma, L. T., Nakamura, R. E., Nguyen, J. G. and Michels, K. B. (2020). Does Consumption of Fermented Foods Modify the Human Gut Microbiota?. *The Journal of Nutrition*, 150(7), 1680-1692.
71. Bell, V., Ferrão, J., Pimentel, L., Pintado, M. and Fernandes, T. (2018). One Health, Fermented Foods, and Gut Microbiota. *Foods*, 7(12), 195.

72. Peluzio, M. D. C. G., Dias, M. D. M. E., Martinez, J. A. and Milagro, F. I. (2021). Kefir and İntestinal Microbiota Modulation: İmplications in Human Health. *Frontiers in Nutrition*, 8, 638-740.
73. Kim, D. H., Jeong, D., Kang, I. B., Lim, H. W., Cho, Y. and Seo, K. H. (2019). Modulation of the İntestinal Microbiota of Dogs by Kefir as a Functional Dairy Product. *Journal of Dairy Science*, 102(5), 3903-3911.
74. Yılmaz, İ., Dolar, M. E. ve Özpınar, H. (2019). Effect of Administering Kefir on the Changes in Fecal Microbiota and Symptoms of İnflammatory Bowel Disease: A Randomized Controlled Trial. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 30(3), 242.
75. Curciarello, R., Canziani, K. E., Salto, I., Barbiera Romero, E., Rocca, A., Doldan, I. and Muglia, C. I. (2021). Probiotic Lactobacilli İsolated from Kefir Promote Down-Regulation of İnflammatory Lamina Propria T Cells From Patients with Active İBD. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 658026.
76. Chen, W., Wang, J., Du, L., Chen, J., Zheng, Q., Li, P. and Liao, Z. (2022). Kefir Microbiota and Metabolites Stimulate İntestinal Mucosal İmmunity and İts Early Development. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-14.
77. Akal, C. Ve Yetişemiyen, A. (2020). Probiyotik ve Prebiyotik Tüketiminin Laktoz İntoleransı Üzerine Etkileri. *GIDA/The Journal of FOOD*, 45(2), 380-389.
78. Hertzler, S. R. and Clancy, S. M. (2003). Kefir İmproves Lactose Digestion and Tolerance in Adults with Lactose Maldigestion. *Journal of the American Dietetic association*, 103(5), 582-587.
79. Mustapha, A., Jiang, T. and Savaiano, D. A. (1997). Improvement of Lactose Digestion by Humans Following İngestion of Unfermented Acidophilus Milk: İncidence of Bile Sensitivity, Lactose Transport, and Acid Tolerance of Lactobacillus Acidophilus. *Journal of Dairy Science*, 80(8), 1537-1545.
80. González-Orozco, B. D., García-Cano, I., Jiménez-Flores, R. and Álvarez, V. B. (2022). Invited Review: Milk Kefir Microbiota—Direct and İndirect Antimicrobial Effects. *Journal of Dairy Science*.105(5), 3703-3715.
81. Kim, D. H., Jeong, D., Kim, H., Kang, I. B., Chon, J. W., Song, K. Y. and Seo, K. H. (2016). Antimicrobial Activity of Kefir Against Various Food Pathogens and Spoilage Bacteria. *Korean journal for food science of animal resources*, 36(6), 787.
82. Erdoğan, S. F. ve Bostancı, B. (2020). Kefir Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Antimikrobiyal Etkilerinin Değerlendirilmesi. *Gıda*, 45(1), 72-80.

83. Tenorio-Salgado, S., Castelán-Sánchez, H. G., Dávila-Ramos, S., Huerta-Saquero, A., Rodríguez-Morales, S., Merino-Pérez, E. and Lizama-Uc, G. (2021). Metagenomic Analysis and Antimicrobial Activity of Two Fermented Milk Kefir Samples. *MicrobiologyOpen*, 10(2), e1183.
84. Gürbüz, P., Yetiş, G. ve Çelikhan, G. (2016). Obezite ve Yağ Dokusu. *İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Dergisi*, 4(2), 32-43.
85. Hosainzadegn, H., & Hosainzadegan, M. (2021). Traditional Probiotic (Kefir) Effects on Glycated Hemoglobin a Level and Weight of an Indexed Diabetic Patient. *International Journal of Preventive Medicine*, 12.
86. Bourrie, B. C., Cotter, P. D. And Willing, B. P. (2018). Traditional Kefir Reduces Weight Gain and Improves Plasma and Liver Lipid Profiles More Successfully than a Commercial Equivalent in a Mouse Model of Obesity. *Journal of Functional Foods*, 46, 29-37.
87. Lim, J., Kale, M., Kim, D. H., Kim, H. S., Chon, J. W., Seo, K. H., Lee H. K., Yokoyama, W., and Kim, H. (2017). Antiobesity Effect of Exopolysaccharides Isolated from Kefir Grains. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(46), 10011-10019.
88. Bellikci-Koyu, E., Sarer-Yurekli, B. P., Karagozlu, C., Aydin-Kose, F., Ozgen, A. G. and Buyuktuncer, Z. (2022). Probiotic Kefir Consumption Improves Serum Apolipoprotein A1 Levels in Metabolic Syndrome Patients: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Nutrition Research*, 102, 59-70.
89. Ghizi, A. C. D. S. (2016). *Uso Do Kefir Em Pacientes Com Síndrome Metabólica Determina Melhoria Nos Parâmetros Que Compõem Esta Síndrome E Redução Do Risco Cardiovascular*. Universidade vila velha- es, Programa de Pos Graduação em Ciencias Farmaceuticas, Brasil.
90. Kim, D. H., Kim, H., Jeong, D., Kang, I. B., Chon, J. W., Kim, H. S., ... & Seo, K. H. (2017). Kefir Alleviates Obesity and Hepatic Steatosis in High-Fat Diet-Fed Mice by Modulation of Gut Microbiota and Mycobiota: Targeted And Untargeted Community Analysis with Correlation of Biomarkers. *The Journal of nutritional biochemistry*, 44, 35-43.
91. Fathi, Y., Ghodrati, N., Zibaeenezhad, M. J. And Faghieh, S. (2017). Kefir Drink Causes a Significant Yet Similar Improvement in Serum Lipid Profile, Compared With Low-Fat Milk, in a Dairy-Rich Diet in Overweight or Obese Premenopausal Women: A Randomized Controlled Trial. *Journal of clinical lipidology*, 11(1), 136-146.
92. Alihosseini, N., Moahboob, S. A., Farrin, N., Mobasser, M., Taghizadeh, A. and Ostadrahimi, A. R. (2017). Effect of Probiotic Fermented Milk (Kefir) on Serum Level of Insulin and Homocysteine in Type 2 Diabetes Patients. *Acta Endocrinologica (Bucharest)*, 13(4), 431.

93. Punaro, G. R., Maciel, F. R., Rodrigues, A. M., Rogero, M. M., Bogsan, C. S., Oliveira, M. N., Ihara, S.M., Araujo S. R., Sanches, T.R., Andrade, L.C. and Higa, E. M. (2014). Kefir Administration Reduced Progression of Renal Injury in STZ-Diabetic Rats by Lowering Oxidative Stress. *Nitric Oxide*, 37, 53-60.
94. Akbay, G. D. (2020). Kefirin Antikanserojenik Rolü. *Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 5(2), 73-82.
95. Fatahi, A., Soleimani, N., & Afrough, P. (2021). Anticancer Activity of Kefir on Glioblastoma Cancer Cell as a New Treatment. *International Journal of Food Science*, 2021, 5.
96. Smoak, P., Harman, N., Flores, V., Kisiolek, J., Pullen, N. A., Lisano, J., Hayvard R. and Stewart, L. K. (2021). Kefir Is a Viable Exercise Recovery Beverage for Cancer Survivors Enrolled in a Structured Exercise Program. *Med. Sci. Sports Exerc*, 53, 2045-2053.
97. Ardil, B. (2022). *HT-26 İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattında Eriodictyol ve Brusatol'un 5-Florourasil ile Kullanımının Hücre Canlılığı ve Apoptoz Üzerindeki Potansiyel Etkilerinin Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla.
98. Çetinkaya, M. ve Şahin, S. (2020). Kanser ve Ergoterapi. *Gazi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(2), 14-24.
99. Yokuş, B. ve Çakır D. Ü. (2012). Kanser Biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, (1), 7-18.
100. Aktaş, S.H. (2010). *Kemoterapinin Kolon Kanseri, Meme Kanseri ve Mide Kanserinde VEGF Düzeylerine Etkisinin İn Vivo ve İn Vitro Deneylerle İncelemesi*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
101. Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3), 154-165.
102. <https://www.losante.com.tr/Content/brosur/DS%C3%96%20Kanser%20Verileri%20Tablo%20%C3%87evirisi.pdf>
103. Güneş, G. (2022). *Kolon Kanseri Tanısında ve Yaygınlığında Cxcl-8'in Yeri, Prediktif Biyomarker Olarak Kullanılabilirliği*. Tıpta Uzmanlık, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Şehir Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği, Ankara.
104. <http://www.kolonkanseritedavisi.com/genel-bilgi>
105. Amanpour, A., Kahraman, S., Karakaş, P. E., ve Çelik, F. Kolorektal Kanser, Bağırsak Mikrobiyotası ve Beslenme. *Bandırma Onyedü Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri ve Araştırmaları Dergisi*, 4(1), 50-59.

106. <https://www.kolonrektum.com/kolon-kanseri-kalin-bagirsak-kanseri>
107. Güvenir, E. (2015). *SW480 ve DLD-1 Kolon Kanseri Hücre Hatlarında Epibrassinolide ile Tetiklenen Apoptozun Moleküler Hedeflerinin Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Kültür Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
108. Darendelioğlu, E. (2017). *İnsan Kolon Kanseri Hücrelerinde (HT-29) Lactobacillus reuteri Türünden Elde Edilen Bazı Kısa Zincirli Yağ Asitlerinin Apoptotik Etkilerinin Araştırılması*. Doktora Tezi, Bingöl-Bitlis Eren Üniversiteleri, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitlis.
109. Özyarım, Ş.C. (2020). *İnsan Kolon Kanseri CCL-233 Hücrelerinde Borun Apoptotik ve Antianjiyogenik Etkilerinin Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Uşak Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Uşak.
110. Ünal, F. N. Kalyas, A., Gürbüz, Z., Şengül, M., & Ürkek, B. (2020). Ticari Kefirlerin Bazı Kalite Parametrelerinin Belirlenmesi. *Gıda*, 45(3), 555-563.
111. Metin, M. (2009). *Süt ve Mamülleri Analiz Yöntemleri*. Ege Üniversitesi Ege Meslek Yüksekokulu Yayınları No:24, 4. Baskı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
112. Kurt, A. Çakmakçı, S. ve Çağlar, A. (2007). *Süt ve Mamülleri Muayene ve Analiz Metotları Rehberi*. Atatürk üniversitesi Ziraat Fakültesi, Erzurum.
113. Halkman, K. (2005). *Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları* (Birinci baskı). Ankara: Başak Matbaacılık, 76-84.
114. Purutoğlu, K., İspirli, H., Yüzer, M. O., Serencam, H., & Dertli, E. (2020). Diversity and Functional Characteristics of Lactic Acid Bacteria from Traditional Kefir Grains. *International Journal of Dairy Technology*, 73(1), 57-66.
115. Bell, C., Neaves, P. and Williams, A. P. (2005). Food Microbiology and Laboratory Practice (First edition). *Oxford: Blackwell Science*, 253-254.
116. Otles, S. and Cagindi, O. (2003). Kefir: A Probiotic Dairy Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2(2), 54-55.
117. Öngün, P. (2015). *Anne Sütünden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Karakterizasyonu, Bazı Probiyotik ve Starter Özelliklerinin Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aksaray.
118. Ioanna, M. I., Chondrou, P., Bontsidis, C., Karolidou, K., Terpou, A., Alexopoulos, A., Bezirtzoglou, E., Galanis, A. and Plessas, S. (2019). Assessment of the Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Kefir Grains: Evaluation of Adhesion and Antiproliferative Properties in *In vitro* Experimental Systems. *Annals of Microbiology*, 69(1), 751–763

119. Kaewnopparat, S., Dangmanee, N., Kaewnopparat, N., Srichana, T., Chulasiri, M. and Settharaksa, S. (2013). In vitro Probiotic Properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 Isolated from Vagina of a Healthy Woman. *Anaerobe*, 22(2), 6-13.
120. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2016). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. *United States: Wayne Press*.
121. Mollayeva, N. (2019). *Azerbaycan'ın Farklı Gıda Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Bakteriyosin Üretim Yeteneklerinin Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
122. Albayati, A. A. K. (2014). *Isolation and Molecular Identification of Some Lactic Acid Bacteria from Traditionally Made Fermented Food*. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
123. Ammar, A., Volski, Cugini, C., Walsh, E., Chistyakov, V., Mazanko, M., Bren, A., Dicks, L. and Chikindas, M. (2016). Safety Properties and Probiotic Potential of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Advances in Microbiology*, 6(1), 432-452.
124. Okolie, P. I., Opara, C. N., Emerenini, E. C., & Uzochukwu, S. V. A. (2013). Evaluation of Bacterial Diversity in Palm Wine by 16S rDNA Analysis of Community DNA. *Nigerian Food Journal*, 31(1), 83-90.
125. Wang, J., Zhao, X., Yang, Y., Zhao, A., & Yang, Z. (2015). Characterization and Bioactivities of an Exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus plantarum* YW32. *International journal of biological macromolecules*, 74, 119-126.
126. Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assay and Cell Biology. *Journal of Immunological Methods*, 65(2), 55-63.
127. Uslu, G. (2010). *Ankara Piyasasında Satılan Kefirlerin Mikrobiyolojik, Fiziksel, Kimyasal ve Duyusal Özellikleri Üzerine Bir Araştırma*, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
128. Garrote, G. L., Abraham, A. G. and De Antoni, G. L. (2001). Chemical and Microbiological Characterisation of Kefir Grains. *Journal of dairy research*, 68(4), 639-652.
129. Motaghi, M., Mazaheri, M., Moazami, N., Farkhondeh, A., Fooladi, M. H. and Goltapeh, E. M. (1997). Kefir Production in Iran. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(5), 579-581.

130. Sulmiyati, N. S. S., Fahrodi, D. U., & Ratmawati Malaka, F. (2018). Perbandingan Kualitas Fisiokimia Kefir Susu Kambing dengan Kefir Susu Sapi. *Jurnal Veteriner Juni*, 19(2), 263-268.
131. Lengkey, H. A., Siwi, J. A., & Balia, R. L. (2013). The Effect of Various Starter Dosages on Kefir Quality. *Lucrări Științifice-Seria Zootehnie*, 59, 113-116.
132. Khaze Hagh, S. (2018). *Farklı sütlerden (inek, manda, keçi, deve) Yapılan Kefirlerin Bazı Kimyasal ve Mikrobiyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Aydın Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
133. Öksüztepe, G., Demir, P., Karatepe, P., Alan, S. ve Akgöl, M. (2020). Ticari Kefirlerin Bazı Kalite Parametrelerinin İncelenmesi. *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University*, 5(2), 40-47.
134. Ak, G. (2018). *Yenilebilir Kıvamda Üretilen Meyveli Kefirlerin Fizikokimyasal, Duyusal ve Mikrobiyolojik Özellikleri*. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
135. Akdan, C., Kımık, Ö. ve İçier, F. (2020). Manda Sütü ve Diğer Süt Karışımlarıyla Üretilen Kefirlerin Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 39-50.
136. Erdogan, F. S., Ozarslan, S., Guzel-Seydim, Z. B., & Taş, T. K. (2019). The Effect of Kefir Produced from Natural Kefir Grains on the İntestinal Microbial Populations and Antioxidant Capacities of Balb/c mice. *Food Research International*, 115, 408-413.
137. Ertekin, Ö. ve Çon, A. H. (2014). Farklı Gıdalardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Endüstriyel ve Probiyotik Özellikleri. *Akademik Gıda*, 12(4), 6-16.
138. Kılıç, G. B., Kaçar, H., Özkan, S., Ballı, S., Sönmez, E. ve Erfilibeli, O. Tereyağı Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Bazı Endüstriyel Özelliklerinin Belirlenmesi. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 11(2), 223-229.
139. Tangüler, H. ve Erten, H. (2012). Şalgam Suyu Üretiminde Gerçekleştirilen Hamur Fermantasyonu Sırasında İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması. *Akademik Gıda*, 10(2), 48-54.
140. Bingöl, M. G., ve Şengün, İ. (2022). Susuz Lahana Turşusundan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Potansiyeli. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 15(1), 38-49.
141. Cebeci Avunca, S. (2022). *Yoğurt Altı Suyu ve Sirke İle Üretilen Fermente Salatalık Turşularında Bulunan Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması*. Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Sakarya.

142. Angelescu, I. R., Zamfir, M., Stancu, M. M., and Grosu-Tudor, S. S. (2019). Identification and Probiotic Properties of Lactobacilli Isolated from Two Different Fermented Beverages. *Annals of Microbiology*, 69(13), 1557-1565.
143. Sharifi Yazdi, M. K., Davoodabadi, A., Khesht Zarin, H. R., Tajabadi Ebrahimi, M. and Soltan Dallal, M. M. (2017). Characterisation and Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Iranian Traditional Yogurts. *Italian Journal of Animal Science*, 16(2), 185-188.
144. Balamurugan, R., Chandragunasekaran, A. S., Chellappan, G., Rajaram, K., Ramamoorthi, G. and Ramakrishna, B. S. (2014). Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Present in Home Made Curd in Southern India. *The Indian Journal of Medical Research*, 140(3), 345.
145. Turhan, E. Ü., & Enginkaya, Z. (2016). Probiyotik gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 22(7), 620-624.

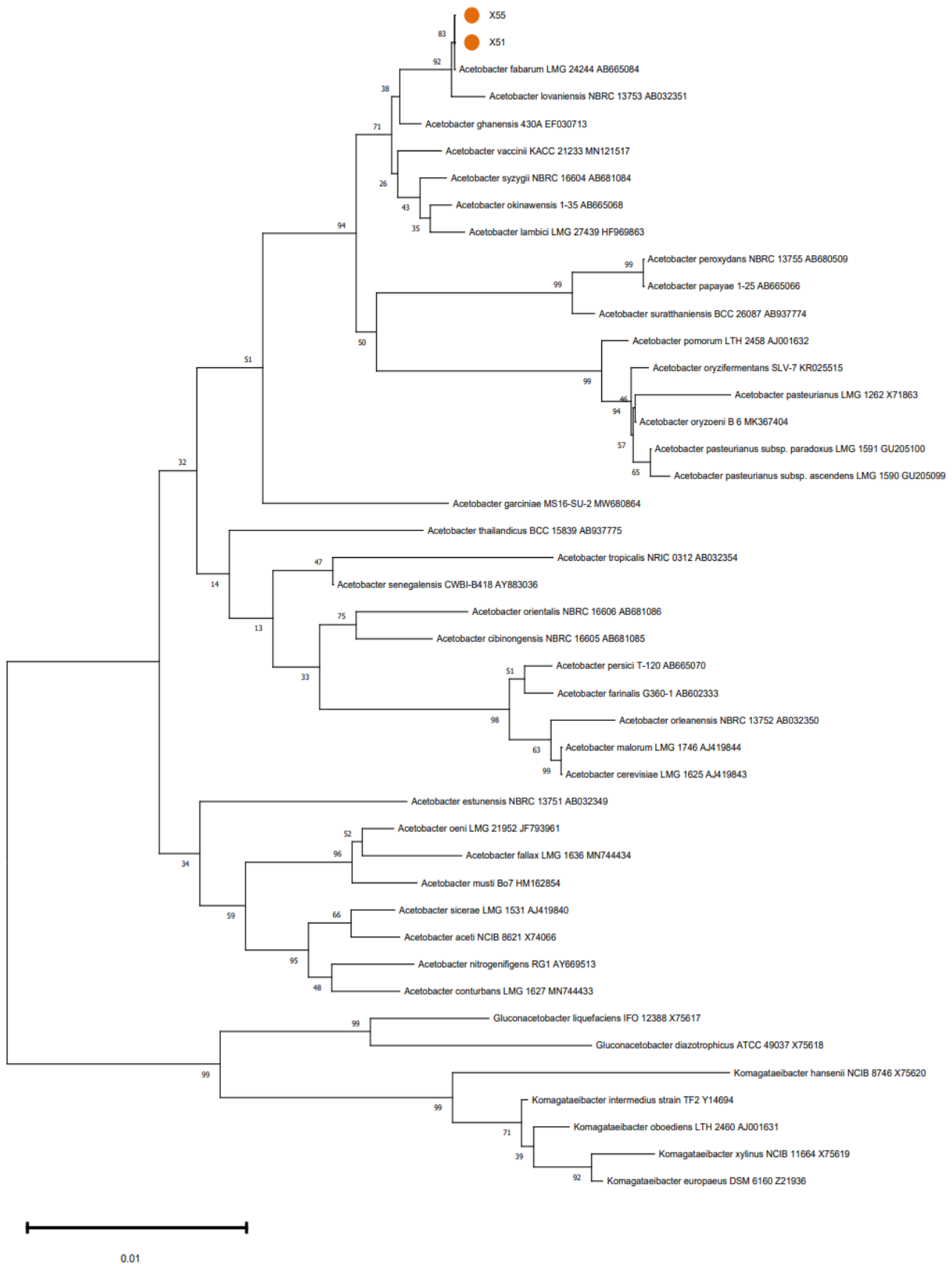


EKLER

EK-1 Dizi analizi sonucu (Y54)



EK-2 Dizi analizi sonucu (X55, X51)



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :

Doğum Yeri :

Doğum Tarihi :

EĞİTİM DURUMU

Lise : Amasya Anadolu Lisesi (2013)

Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Yüksek Okulu
Beslenme ve Diyetetik (2018)

İLETİŞİM

E-posta Adresi: