



**LOKAL OLARAK İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN PROBİYOTİK OLARAK
KULLANILABİLME POTANSİYELLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

SÜMEYYE AKBULUT

Doktora Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

2023

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

**LOKAL OLARAK İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN
PROBİYOTİK OLARAK KULLANILABİLME POTANSİYELLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

(Investigation of the Potential Use of Locally Isolated Lactic Acid Bacteria as Probiotics)

DOKTORA TEZİ

SÜMEYYE AKBULUT

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Erzurum

Ocak, 2023

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

LOKAL OLARAK İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN PROBİYOTİK OLARAK
KULLANILABİLME POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında, Sümeyye AKBULUT tarafından hazırlanan bu çalışma, 20/01/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu** (.../...) ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Ahmet ERDOĞAN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Mesut TAŞKIN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Kenan KARAGÖZ <i>Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Burak ALAYLAR <i>Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır

Enstitü Yönetim
Kurulunun .../.../.... tarih
ve sayılı kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof.Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: FDK-2021-8705

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Graduate School of Natural and
Applied Sciences

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak *Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL* danışmanlığında sunulan “Lokal Olarak İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Olarak Kullanılabilme Potansiyellerinin Araştırılması” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	17	30
Kuramsal Temeller	3	30
Materyal ve Metot	32	35
Araştırma Bulguları	4	20
Tartışma, Sonuçlar ve Öneriler	13	20
Tezin Geneli	18	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Sunulan bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ettiğimizi beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Sümeyye AKBULUT	Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
6.2.2023	6.2.2023
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☒ Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunulan bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından FDK-2021-8705 nolu Doktora Tez Projesi kapsamında alınan destek ile Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL yöneticiliğinde hazırlanmıştır.

Tez dönemim boyunca gerekli olan her türlü imkanı sağlayan ve güleryüzünü hiçbir zaman esirgemeyen Fen Fakültesi Dekanı sayın Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN' a

Lisans, yüksek lisans, doktora öğrenimim ve tez çalışmalarım süresince başaramaya her zaman gönülden inanarak beni yüreklendiren ve bu günlere gelmemi sağlayan, bu tezin hazırlanması sırasında yaptığım çalışmalarda benimle değerli fikirlerini paylaşan, stresli tez dönemim boyunca bana her türlü kolaylığı sağlayan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e,

Tezimin her aşamasında sürekli iletişimde bulunduğum, laboratuvar çalışmalarım ve tez yazımda yardımlarını esirgemeyen, doktora eğitimim boyunca engin bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, güleryüzünü ve ilgisini hiçbir zaman eksik etmeyen kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Mesut TAŞKIN'a

Tez dönemim boyunca tez izleme komitelerime sabırla katılan, engin bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, kendisinden çok şey istifade ettiğim değerli jüri üyesi hocam sayın Prof. Dr. Ahmet ERDOĞAN' a

Tez çalışmamın belirli aşamalarında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, çalışmam boyunca ihtiyacım olan her türlü materyali temin etme konusunda yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Gülşah ÇANAKÇI ADIGÜZEL'e,

Doktora eğitimim boyunca çıkmaza girdiğim her anımda yanımda olan, hem sevincimi hem hüznümü paylaştığım her daim desteklerini arkamda hissettiğim çok kıymetli arkadaşlarım Araş. Gör. Emine TORAMAN' a ve Araş. Gör. Elanur DAŞDEMİR' e,

Doktora eğitimim sırasında fikirlerini benimle paylaşan ve manevi desteğini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Özkan BALTAÇI' ya

Stresli tez dönemimde her daim bana destek olan ve her türlü fedakarlığı gösteren eşim Abdussamed AKBULUT' a teşekkürü bir borç bilirim.

Sümeyye AKBULUT

ÖZET

DOKTORA TEZİ

LOKAL OLARAK İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN PROBİYOTİK OLARAK KULLANILABİLME POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sümeyye AKBULUT

Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Amaç: Bu tez çalışmasında, laktik asit bakterileri (LAB) açısından zengin bir mikrofloraya sahip olduğu bilinen çeşitli fermente ürünlerden (sucuk, peynir) LAB'nin izolasyonu, identifikasyonu ve elde edilen LAB izolatlarının probiyotik olarak kullanılabilme potansiyelleri araştırıldı.

Yöntem: Tez çalışması kapsamında öncelikle, belirlenen fermente ürünler toplandı ve bakteri izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen izolatların LAB olup olmadıkları fenotipik testlerle belirlendi. Probiyotik olarak kullanılabilme potansiyeline sahip bakterileri tespit etmek amacıyla ilk aşamada; izolatların hemolitik aktivitelerine bakıldı. Daha sonra izolatların düşük pH' ya ve gastrointestinal koşullara direnç yetenekleri araştırıldı. Bu koşullarda yaşayabilen izolatlar seçildi ve B12 vitamini üretim potansiyelleri HPLC yöntemi ile tespit edildi. İzolatların β -Galaktosidaz enzim aktiviteleri API ZYM yöntemi ile incelendi. Kolesterolü düşürme yetenekleri ve linoleik asit üretim potansiyelleri spesifik PCR analizi ile belirlendi. Disk difüzyon metodu ile antimikrobiyal aktiviteleri belirlenen izolatların, spesifik PCR analizi ile virülans potansiyelleri tespit edildi. Son olarak; probiyotik olarak kullanılabilme potansiyeline sahip izolatlar, 16S rRNA sekans analizi ile moleküler olarak tanımlanıp identifiye edildi.

Bulgular: Belirlenen kaynaklardan, toplamda 86 adet izolat elde edildi ve fenotipik karakterizasyon sonucunda 80 adet izolatın LAB olabileceği düşünülerek, hemolitik aktiviteleri belirlendi. 75 adet izolatın γ -hemolitik olduğu tespit edildi. Bunlardan 20 tanesinin düşük pH' ya, 10 adetinin ise gastrointestinal koşullara dirençli olduğu tespit edildi. Yine 10 adet izolatın HPLC ile B12 vitamini üretim potansiyelleri belirlendiğinde; hepsinin B12 vitamini üreticisi olduğu görüldü. Daha sonra β -Galaktosidaz aktivitesi, kolesterolü düşürme yeteneği, linoleik asit üretim potansiyeli, antimikrobiyal aktiviteleri açısından test edilen ve her bir parametrede pozitif sonuç veren SS 9, 20, 30 ve 33 kodlu izolatlar moleküler olarak tür bazında tanımlandı.

Sonuçlar: Elde edilen bu verilerden yola çıkılarak; hemen hemen tüm parametreler açısından pozitif sonuç veren SS 9, 20, 30 ve 33 kodlu izolatların probiyotik potansiyelli bakteriler olduğu düşünülmektedir. Bu dört izolatın mutlak anlamda probiyotik bakteri olması ve patent noktasına taşınabilmesi açısından ek parametrelere ve daha ileri boyutlu çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: izolasyon, laktik asit bakterisi, probiyotik bakteri, hemoliz, moleküler identifikasyon

Ocak 2023, 88 Sayfa

ABSTRACT

DOCTORAL DISSERTATION

INVESTIGATION OF THE POTENTIAL USE OF LOCALLY ISOLATED LACTIC ACID BACTERIA AS PROBIOTICS

Sümeyye AKBULUT

Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Purpose: In this thesis, the isolation and identification of LAB from various fermented products (sucuk, cheese) known to have a microflora rich in lactic acid bacteria (LAB) and the potential of the obtained LAB isolates to be used as probiotics were investigated.

Method: Within the scope of the thesis, first of all, the determined fermented products were collected and bacterial isolation was performed. Whether the obtained isolates were LAB or not was determined by phenotypic tests. In the first stage, in order to detect bacteria that have the potential to be used as probiotics; The hemolytic activities of the isolates were examined. Then, the resistance abilities of the isolates to low pH and gastrointestinal conditions were investigated. Isolates that could survive under these conditions were selected and their production potential of vitamin B12 was determined by HPLC method. β -Galactosidase enzyme activities of the isolates were analyzed by API ZYM method. Their cholesterol lowering abilities and linoleic acid production potential were determined by specific PCR analysis. Virulence potentials were determined by specific PCR analysis of the isolates whose antimicrobial activities were determined by the disc diffusion method. Finally; The isolates with the potential to be used as probiotics were molecularly identified by 16S rRNA sequence analysis.

Findings: A total of 86 isolates were obtained from the determined sources, and as a result of phenotypic characterization, the hemolytic activities of 80 isolates were determined, considering that they might be LAB. It was determined that 75 isolates had γ -hemolytic. It was determined that 20 of them were resistant to low pH and 10 of them were resistant to gastrointestinal conditions. Again, when the vitamin B12 production potentials of 10 isolates were determined by HPLC, it was seen that all of them were vitamin B12 producers. Then, SS 9, 20, 30, 33 coded isolates that were tested for β -Galactosidase activity, cholesterol lowering ability, linoleic acid production potential, antimicrobial activities and antibiotic resistance mechanisms and giving positive results in each parameter were molecularly identified.

Conclusions: Based on these data, it was seen that the SS 9, 20, 30, 33 coded isolates, whose almost all parameters were completed with a positive result, are considered to be bacteria with probiotic potential. Additional parameters and further studies are needed to ensure that these four isolates are absolutely probiotic bacteria and can be carried to the patent point.

Keywords: isolation, lactic acid bacteria, probiotic bacteria, hemolysis, molecular identification

January 2023, 88 Pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI	iii
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	xiii
GİRİŞ	1
Fermantasyon	1
Fermente Gıda Grupları	1
Peynir	1
Fermente et ve et ürünleri.....	2
Fermente Gıdalardaki Laktik Asit Bakteri Florası	3
Laktik Asit Bakterileri	8
Laktik Asit Bakterilerinin Metabolizmaları	10
LAB'nin homofermentatif metabolizması	10
LAB'nin heterofermentatif metabolizması	11
Laktik Asit Bakterilerinin Uygulama Alanları	11
Fermente gıdalar için starter kültür olarak kullanılma.....	11
Biyo koruyucu kültürler olarak kullanılma	12
Probiyotik kültürler olarak kullanılma	13
KURAMSAL TEMELLER.....	18
MATERYAL VE METOD	25
Kullanılan Kimyasallar	25
Kullanılan Materyaller ve Cihazlar.....	28
Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı	29
Bakteri İzolasyonu	30

Örneklerin toplanması.....	30
Laktik Asit Bakterilerinin izolasyonu	30
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Fenotipik Karakterizasyonu	30
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Hemolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi	31
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Düşük pH' ya Dirençlerinin Belirlenmesi	31
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Gastrointestinal Koşullara Direnç Yeteneklerinin Belirlenmesi.....	31
Pepsin direnci	31
Pankreatin direnci	32
Safra direnci	32
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının B12 Vitamini Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi	33
HPLC ile B12 vitamini analizi için numunenin hazırlanması.....	33
HPLC ile B12 vitamini analizinde standart çözeltilerin hazırlanması.....	33
HPLC ile B12 vitamini analizi metot oluşturulması.....	34
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının β -Galaktosidaz (Laktaz) Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	34
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Kolesterolü Düşürme Potansiyellerinin Belirlenmesi	35
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Linoleik Asit Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi .	36
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi	37
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Virülans Genlerinin Spesifik PCR ile Belirlenmesi ...	37
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Moleküler İdentifikasyonu.....	38
16S rRNA Gen Bölgesinin Klonlanması	39
Genomik DNA izolasyonu	39
DNA konsantrasyonlarının ölçülmesi ve çalışma solüsyonlarının hazırlanması	39
DNA örneğinin ve çalışma solüsyonunun konsantrasyonunun belirlenmesi ($\mu\text{g/ml}$)	39
16S rRNA PCR İşlemi	39
Kompetent Hücrenin Hazırlanması	40
Ligasyon İşlemi	40
Transformasyon İşlemi	40
Koloni Seçme ve Sıvı Kültüre Alma	40
Koloni PCR İçin Hazırlık ve PCR reaksiyonu	40
Plazmitlerin İzolasyonu, Kontrol Edilmesi ve Konsantrasyonlarının Ölçülmesi.....	41
DNA Dizi Analiz Sonuçlarının İşlenmesi ve Değerlendirilmesi	41
ARAŞTIRMA BULGULARI	42
Bakteri İzolasyonu	42

Örneklerin toplanması.....	42
Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu.....	42
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Fenotipik Karakterizasyonu	43
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Hemolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi	43
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Düşük pH' ya Dirençlerinin Belirlenmesi	44
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Gastrointestinal Koşullara Direnç Yeteneklerinin Belirlenmesi.....	46
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının B12 Vitamini Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi	51
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının β -Galaktosidaz (Laktaz) Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	53
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Kolesterolü Düşürme Potansiyellerinin Belirlenmesi	56
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Linoleik Asit Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi	57
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi	58
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Virülans Genlerinin Spesifik PCR ile Belirlenmesi .	60
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Moleküler İdentifikasyonu.....	60
İzolatların 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılması	60
16S rRNA gen bölgesinin klonlanması.....	61
16S rRNA sekans analizi	62
Probiyotik Potansiyelli Olduğu Düşünülen İzolatlara Ait Tüm Parametrelerden Elde Edilen Sonuçlar.....	62
TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER.....	64
Tartışma.....	64
Sonuç ve Öneriler	72
KAYNAKÇA	74
ÖZ GEÇMİŞ.....	88

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1. Bazı Fermente Gıda Ürünlerinde Bulunan Laktik Asit Bakteri (LAB) Türleri	4
Tablo 2. Tez Dahilinde Kullanılan Kimyasallar, Besiyerleri ve Kitler	25
Tablo 3. Tez Dahilinde Kullanılan Materyal ve Cihazlar	28
Tablo 4. Tez Dahilinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı	29
Tablo 5. CHO (Kolesterol oksidaz) PCR Protokolü	35
Tablo 6. LA1 (Linoleik asit) PCR Protokolü	37
Tablo 7. Virülans Genlere Ait PCR Protokolü	38
Tablo 8. 16S rRNA PCR Protokolü	39
Tablo 9. Koloni PCR Protokolü	41
Tablo 10. İzolatların Düşük pH' larda Gelişim Değerleri	45
Tablo 11. İzolatların Pepsine Karşı Dirençleri	47
Tablo 12. İzolatların Pankreatine Karşı Dirençleri	48
Tablo 13. İzolatların Safra Tuzlarına Karşı Dirençleri	49
Tablo 14. İzolatların B12 Vitamini Üretebilme Potansiyelleri	52
Tablo 15. İzolatların β -galaktosidaz (laktaz) Aktiviteleri	53
Tablo 16. İzolatların Kolesterol Düşürücü Etkileri	57
Tablo 17. Antimikrobiyal Analiz Sonuçları (İnhibisyon zonları (mm))	59
Tablo 18. İzolatların 16S rRNA Dizi Analiz Sonuçları	62
Tablo 19. SS9, SS20, SS30 ve SS33 Kodlu İzolatların Fenotipik Karakterizasyon Sonuçları	62
Tablo 20. SS9, SS20, SS30 ve SS33 Kodlu İzolatların Tüm Parametrelere Ait Elde Edilen Sonuçları	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Son sistematik verilere göre LAB cinsleri	10
Şekil 2. Homofermantatif (A) ve heterofermantatif metabolizma (B)	11
Şekil 3. Bakteriyosin üreten LAB' nin potansiyel fonksiyonları	13
Şekil 4. WHO/FAO'ya göre probiyotik suşların karakterizasyonu	14
Şekil 5. WHO' ya göre probiyotik ürün geliştirmek için takip edilecek genel basamaklar	15
Şekil 6. Laktik asit bakterilerinin (LAB) bağırsak yolu üzerindeki probiyotik etkisi	16
Şekil 7. Probiyotik bakteri gruplarının filogenetik ilişkisi.....	17
Şekil 8. B12 vitamini için kalibrasyon eğrisi.	33
Şekil 9. 50 ppm B12 vitamin standart kromatogramı.	34
Şekil 10. Çeşitli izolatlara ait petri görüntüleri	42
Şekil 11. Çeşitli izolatlara ait sıvı kültür görüntüleri.....	43
Şekil 12. Çeşitli izolatlara ait γ -hemolitik aktivite görüntüleri	44
Şekil 13. Pozitif kontrol olarak seçilen <i>Bacillus cereus</i> ve <i>Staphylococcus aureus</i> a ait.....	44
Şekil 14. SS18 kodlu izolatın pepsin varlığında gelişim gösterdiği petri görüntüsü.....	50
Şekil 15. SS38 kodlu izolatın pankreatin varlığında gelişim gösterdiği petri görüntüsü	51
Şekil 16. SS29 kodlu izolatın safra tuzu varlığında gelişim gösterdiği petri görüntüsü.....	51
Şekil 17. API ZYM okuma tablosu	55
Şekil 18. β -galaktosidaz (laktaz) aktivitesi gösteren izolata ait API ZYM test stripi	55
Şekil 19. β -galaktosidaz (laktaz) aktivitesi göstermeyen izolata ait API ZYM test stripi.....	55
Şekil 20. SS9, SS20, SS30 ve SS33 kodlu izolatlara ait Kolesterol Oksidaz (CHO) genine ait bant profili	56
Şekil 21. SS9, SS20, SS30 ve SS33 kodlu izolatlara ait Linoleik Asit (LA1) genine ait bant profili	58
Şekil 22. İzolatların antimikrobiyal etkileri [(İnhibisyon zonları (Petri görüntüsü))	59
Şekil 23. İzolatlara ait 16S rRNA PCR bant görüntüsü.....	60
Şekil 24. Mavi beyaz tarama	61
Şekil 25. İzolatların koloni PCR bant profilleri	61

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

Kısaltmalar

LAB : Laktik Asit Bakteri

NaCl : Sodyum Klorid

KOH : Potasyum hidroksid

H₂O₂ : Hidrojen Peroksit

Kob : Koloni oluşturan birim

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

MgCl₂ : Magnezyum Klorür

dNTP : Deoksiribonükleotid trifosfat

LA : Linoleik Asit

CLA: Konjüge Linoleik Asit

MCO: Multicopper Oksidaz

CHO: Kolesterol Oksidaz

EDTA: Etilendiamin Tetraasetik Asit

TE: Tris EDTA

CaCl₂: Kalsiyum Klorid

Xgal: 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β -D-Galactopyranoside

IPTG: Izopropil β -D-1- Tyogalaktopiranosid

Simgeler

g : Gram

dk: Dakika

mL: Mililitre

μ L: Mikrolitre

$^{\circ}$ C: Santigrat derece

s: Saniye

mg: Miligram

ng: Nanogram

%:Yüzde

bç:Bazçifti

GİRİŞ

Fermantasyon

Fermantasyon, gıdaları korumak için mikroorganizmaların büyüme ve metabolik aktivitelerinin kullanıldığı, Dünyadaki en eski gıda hazırlama metodudur. Az enerji gerektiren ve ucuz bir süreç olan fermantasyon tekniği gıda üretimi için tercih edilen temel stratejidir. Gıda fermantasyonu; aerobik fermantasyon (mantar ve alkali fermantasyon) ve anaerobik fermantasyon (laktik asit fermantasyonu) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Fermentasyon sırasında mikroorganizmalar, fermente edilebilir karbohidratları; organik asit, karbondioksit ve alkol gibi son ürünlere ve ayrıca gıda kaynaklı patojenleri öldürerek veya inhibe ederek gıda güvenliğini artıran bakteriyosinler gibi antimikrobiyal metabolitlere ayırır (Reuben *et al.* 2019; Deng *et al.* 2021). Fermantasyon teknolojisi sayesinde; gıdaların organoleptik özellikleri, proteinlerin ve karbohidratların sindirilebilirliği, vitamin ve minerallerin biyoyararlanımları artırılarak gıdaların raf ömrü uzatılır. Fermantasyon stratejisinin bahsedilen bu yararlı özellikleri sayesinde, fermente yiyecek ve içecekler eski çağlardan beri insan beslenmesinin vazgeçilmez bir parçası olmuştur. Fermantasyon teknolojisinin gıdalar üzerindeki yararlı etkilerinin yanı sıra, kan kolesterol seviyesini düşürme, bağışıklığı artırma, patojenlere karşı koruma, kanserojenez, osteoporoz, diyabet, obezite, alerjiler ve ateroskleroz ile mücadele etme ve laktoz intolerans semptomlarını hafifletme gibi sağlık açısından önemli yararları da bulunmaktadır (Touret *et al.* 2018; Zielińska *et al.* 2018; Reuben *et al.* 2018).

Fermente Gıda Grupları

Fermantasyon teknolojisiyle çok çeşitli gıdaların işlenmesi mümkün olmaktadır. Türkiye’de üretilen fermente gıdalara şu şekilde örnek verilebilir: Fermente et (sucuk, salam ve sosis), fermente süt (ayran, peynir, kımız, kefir, kurut, yoğurt ve torba yoğurt), fermente sebzeler (hardal, turşu ve şalgam), fermente edilmiş meyveler, alkolsüz içecekler (boza) ve tahıl bazlı fermente gıdalar (tarhana) (Mojgani *et al.* 2020; Mbye *et al.* 2020). Bahsedilen bu fermente gıdalar içerisinde tez çalışmada kullanılan peynir ve sucuk gıdalarının özellikleri aşağıda verilmiştir.

Peynir

Oldukça kaliteli bir fermente süt ürünü olan peynir, enerji değeri, yağ, protein, kalsiyum ve B vitamini içeriği yüksek olan bir üründür. Peynir üretimi sırasında, kazeini parçalamak ve

çok çeşitli biyolojik faaliyetlerden sorumlu olan biyoaktif bileşikleri üretmek amacıyla süt, peynir mayası, starter kültür, proteazlar ve peptidazlar kullanılır. Peynir; içerdiği vitamin ve minerallerin yanı sıra özellikle biyoaktif peptidler (antihipertansif, antioksidan, opioid, anti-proliferatif ve antimikrobiyal peptidler ve konjuge linoleik asitler (KLA)) sayesinde hastalıkları önleme ve tedavi etmeden sorumludur (Shi *et al.* 2019; Margalho *et al.* 2021). Peynirin özellikle sahip olduğu anti-kanserojen özelliği, içerdiği konjuge linoleik asitler (KLA) ve sfingolipidlerden kaynaklanmaktadır. Peynirin içeriğinde bulunan en önemli yapıtaşlarından biri olan konjuge linoleik asitler (KLA) antikanserojen özelliklerinin yanında enerji alımını azaltması, enerji harcanmasını artırması, lipid metabolizmasını modüle etmesi, ve iskelet kası metabolizmasını değiştirerek obezite ile savaşması onu oldukça önemli bir besin haline getirmektedir. Anti-kanserojen ve anti-obezite özelliklerine ek olarak, konjuge linoleik asitler (KLA) ile zenginleştirilmiş peynirlerin birçok aterosklerotik biyobelirteç üzerinde olumlu etkilerinin olduğu kanıtlanmıştır (Domingos-Lopes *et al.* 2020; Barzegar *et al.* 2021).

Fermente et ve et ürünleri

Çok eski zamanlara dayanan fermantasyon teknolojisi sürecinde fermente edilen en eski ve en yaygın gıda ürünü fermente et ürünleri olmuştur. Fermente et üretimi birçok biyokimyasal, mikrobiyolojik ve kimyasal değişimler içerir ve bunlar fermente et ürünlerine karakteristik tat, renk, aroma ve koku sağlar. Fermente et ürünlerinde bu karakteristik özelliklerin ortaya çıkmasında önemli katkısı olan laktik asit bakterileri (LAB), etin fermantasyonunda ayrıca pH'yı düşüren, patojenik mikroorganizmaların gelişimini önleyen bakteriyosinleri üreten, et ürünlerinin güvenliğini, stabilitesini ve raf ömrünü artıran unsurlar olarak karşımıza çıkmaktadır (AlKalbani *et al.* 2019).

Fermente et ürünleri arasında en popüler olanı geleneksel Türk sucuğudur. Sucuk; dana veya koyun etinin doğranması, yağ, baharat, koruyucu, renklendirici, katkı maddeleri, LAB ve stafilokoklar gibi starter kültürlerin eklenmesiyle üretilir. Antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinden dolayı, üretimi esnasında ortama nitrit veya nitrat eklenirken, LAB (Laktik Asit Bakterileri)'nin fermantasyonu gerçekleştirebilmesi amacıyla da; substrat görevi görmesi için sükroz veya glikoz eklenir (Feng and Wang 2020; Akova *et al.* 2021). Etin fermantasyonunda kullanılan baskın mikroorganizma grubu LAB'dir. LAB, etin fermantasyonu sırasında asitleştirici olarak görev alırken ayrıca bakteriyosinler ve organik asitleri üreterek patojenik mikroorganizmaların büyümesini engeller. Et fermantasyonunda kullanılan diğer bir mikroorganizma grubu da mikrokoklardır. Bu mikroorganizmalar da nitritleri veya nitratları nitrik okside indirgerler. Sucuk üretiminde farklı mikroorganizma kombinasyonlarının kullanılması, oluşan ürüne; istenen tat, doku ve rengin yanı sıra çeşitli biyokimyasal,

fizikokimyasal ve mikrobiyal özellikler kazandırmaktadır. Fermente et ürünlerinin oluşumunda iki farklı fermentasyon tekniği kullanılmaktadır. Bunlardan biri doğal (kontROLSÜZ) fermentasyon iken bir diğeri ise istenen etkiyi elde etmek için bir başlatıcı kültürün eklendiği kontrollü fermentasyondur. Doğal (kontROLSÜZ) fermentasyon, kontrollü fermentasyona göre duysal özellikler açısından daha üstündür fakat bir diğeryandan da biyojenik amin üreten zararlı bakterilerin oluşumu için de bir fırsat oluşturmaktadır. Bu nedenle, son zamanlarda probiyotik başlatıcı kültürlerin kullanılmasıyla oluşturulan, kontrollü fermentasyon ile üretilen fermente et ürünlerine olan ilgi oldukça artmıştır (Hajfarajollah *et al.* 2018; de Melo Pereira *et al.* 2018). Etin fermentasyonu sırasında eklenen probiyotik starter kültürlerin, ACE inhibitör peptit gibi faydalı biyoaktif peptitler ürettiği, proteolitik etkiyi ve yağ asidi oksidasyonunu inhibe ettiği ve biyojenik amin üreten patojenik mikroorganizmaların büyümesini önlediği görülmüştür. Fermentasyon sırasında eklenen mikrobiyal starter kültürler, ayrıca biyojenik amin seviyesini azaltarak, doğal olarak fermente edilmiş sucuğun mikrobiyal güvenliğini de arttırmaktadır (Ahire *et al.* 2021).

Fermente Gıdalardaki Laktik Asit Bakteri Florası

LAB, çok uzun yıllardan beri fermente gıdaların bileşiminde bulunan önemli özelliklere sahip bir mikroorganizma grubudur. Fermentasyon teknolojisinde özellikle kullanılan LAB'nin ortak özellikleri hepsinin laktik asit üreticisi olmalarıdır. İlk yıllarda LAB'nin yalnızca sütte bulunan şekeri fermente eden bakteriler olduğu düşünülse de, sonraki yıllarda bu bakterilerin çok çeşitli gıdaların içeriğinde bulundukları görülmüştür (Elzeini *et al.* 2021; Rodrigues *et al.* 2021). Bazı LAB, ağız florasında kolonize olurken (oral streptokoklar), bazıları bağırsak (bifidobakteriler, enterokoklar ve bazı laktobasiller) ve bazıları da vajinal mikrobiyotada kolonize olmaktadır. Bunların yanısıra fermente gıdalar olarak bilinen günlük diyetle yer alan yoğurt, peynir, zeytin ve turşu gibi gıdalar da, LAB için önemli kaynaklardır. Özellikle peynir ve diğeryermente süt ürünlerinde olduğu bilinen LAB'nin daha sonra tahıl, sebze, meyve, et vb. gıdalarda da bulunduğu ortaya çıkarılmıştır (Pumriw *et al.* 2021; Rodríguez Arreola *et al.* 2021). Bazı fermente gıda ürünlerinde bulunan Laktik Asit Bakteri (LAB) türleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Bazı Fermente Gıda Ürünlerinde Bulunan Laktik Asit Bakteri (LAB) Türleri (Laosee *et al.* 2022)

Fermente Ürün	İçerdiği Laktik Asit Bakteri Türü
Günlük Ürünler	
Peynir (Mezofilik Kültürler)	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> <i>Leuc. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>
Peynir (Termofilik Kültürler)	<i>Streptococcus thermoplillus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>
Peynir (Karışık Kültürler)	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> <i>S. thermoplillus</i>
Yoğurt	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i>
Fermente Süt	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. rhamnosus</i> <i>Lb. johnsonii</i>
Yakult	<i>Lb. acidophilus</i>
Acidophilus Süt	<i>Lb. acidophilus</i>

Tablo 1. (devamı)

Tereyağı	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i>
	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>
	<i>Leuconoctos menesteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>
Kefir	<i>Lb. kefir</i>
	<i>Lb. kefiranofacies</i>
	<i>Lb. brevis</i>
	<i>Lb. plantarum</i>
	<i>Lb. paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>
	<i>Lc. lactis</i> spp. <i>lactis</i>
	<i>Leuc. mesenteroides</i>
Tarhana	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i>
	<i>Leuc. menesteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>
	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>
	<i>Lb. casei</i>
	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
	<i>Lb. acidophilus</i>
Fermente Et Ürünleri	
Sucuk	<i>Lb. sakei</i>
	<i>Lb. curvatus</i>
	<i>Lb. plantarum</i>
	<i>Lb. pentosus</i>
	<i>Lb. casei</i>
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
	<i>P. acidilactici</i>

Tablo 1. (devamı)

Salam	<i>Lb. sakei</i>
	<i>Lb. plantarum</i>
Sosis	<i>Lb. sakei</i>
	<i>Lb. plantarum</i>
	<i>Lb. curvatus</i>
	<i>Lb. pentosus</i>
	<i>Lc.lactis ssp. lactis</i>
	<i>Weisella hellenica</i>
	<i>W. paramesenteroides</i>
	<i>W. viridescens</i>
Fermente Balık Ürünleri	<i>W. minor</i>
Tayland Balığı	<i>Lb. plantarum</i>
	<i>Lb. reuteri</i>
Meyve ve Sebzeler	
Lahana	<i>Leuc. mesenteroides</i>
	<i>Lb. plantarum</i>
	<i>Lb. brevis</i>
	<i>Lb. fermentum</i>
Salatalık	<i>Lb. brevis</i>
	<i>Lb. plantarum</i>
	<i>Lb. pentosus</i>
	<i>Lb. acidophilus</i>
	<i>Lb. fermentum</i>
	<i>Leuc. mesenteroides</i>

Tablo 1. (devamı)

Zeytin	<i>Lb. brevis</i>
	<i>Lb. plantarum</i>
	<i>Lb. pentosus</i>
Fermente Tahıl Ürünleri	
Ekşi maya	<i>Lb. brevis</i>
	<i>Lb. hilgardii</i>
	<i>Lb. sanfransiscensis</i>
	<i>Lb. farciminis</i>
	<i>Lb. fermentum</i>
	<i>Lb. brevis</i>
	<i>Lb. plantarum</i>
	<i>Lb. amylovorus</i>
	<i>Lb. reuteri</i>
	<i>Lb. pontis</i>
	<i>Lb. panis</i>
	<i>Lb. alimentarius</i>
	<i>W. cibaria</i>
Kimçi	<i>Leuc. mesenteroides</i>
	<i>Lb. plantarum</i>
	<i>W. kimchii</i> sp. nov.
	<i>Lb. kimchi</i>
	<i>Lb. sakei</i>
	<i>W. koreensis</i>

Tablo 1. (devamı)

Buşera	<i>Lb. plantarum</i>
	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>
	<i>Lb. fermentum</i>
	<i>Lb. brevis</i>
	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i>
	<i>S. thermophilus</i>
Pozol	<i>Leuc. mesenteroides</i>
	<i>Lb. plantarum</i>
	<i>Lb. confusus</i>
	<i>Lc. Lactis</i>
	<i>Lc. raffinolactis</i>

Laktik Asit Bakterileri

Laktik Asit Bakterileri (LAB) terimi, 20. Yüzyılın başlarında “süt ekşiten” ve “laktik asit üreten” bakteri gibi terimlerle anılmış fakat daha sonra “karbonhidratların fermentasyonu sırasında son ürün olarak laktik asit üreten Gram pozitif, spor oluşturmeyen, kok veya çubuk şeklindeki bakterilerdir” şeklinde tanımlanmıştır. LAB nin genom büyüklükleri genel olarak 1.8-3.4 M bç arasında değişmektedir ve düşük düzeyde guanin ve sitozin (G+C) oranına sahiplerdir. LAB; *Sporolactobacillus inulinus* hariç spor oluşturmeyen, fakültatif anaerobik, *Pediococcus* cinsi hariç tek düzlemde bölünen ve bazı istisnalar hariç hareketsiz, oksidaz ve benzinin negatif, nitratı nitrite indirgeyemeyen, sitokromları olmayan, jelatinaz negatif, büyüme ve gelişimleri için glikoz ve amonyum yanında bazı vitamin ve aminoasitlere ihtiyaç duyan bakterilerdir (Hatti-Kaul *et al.* 2018; Liu *et al.* 2020; Marchwińska and Gwiazdowska *et al.* 2021). Ayrıca LAB, 10-60 °C gibi farklı sıcaklık aralıklarında ve yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişebilme yeteneğine sahip olup asit veya alkali toleransı olan bakterilerdir. Hemen hemen hepsi anaerobik koşullar altında gelişim gösterse de pek çoğu oksijen varlığında da üreyebilir. LAB sitokrom ve ETS (Elektron Taşıma Sistemi) taşımadıklarından dolayı enerji eldesi yalnızca substrat düzeyinde fosforilasyon ile gerçekleşir. Aerotolerant özelliğe sahip olan LAB, bulundukları ortamda yer alan karbonhidrat kaynaklarından laktik asit gibi organik asitler üretirler. Bundan dolayı LAB, ortamın pH’sını düşürür ve bu düşük pH’larda asit üretir. Birçok bakteri üzerine inhibitör etki yapan LAB,

patojen ve kontaminant organizmaların gelişimlerini ürettikleri laktik asit, hidrojen peroksit, diasetil ve bakteriyosin gibi maddelerle engellmektedir (Bah *et al.* 2019; Wang *et al.* 2021; Bielik *et al.* 2021). Fermente gıdaların bileşiminde bulunan LAB'nin, uzun ömürlü kullanımları onların insan tüketimi için GRAS (Generally Recognized As Safe) olarak kabul edilmelerine katkıda bulunur. LAB ayrıca, aktarılabılır direnç genleri için bir kaynak görevi görmektedir. Aktarılabilen genlere sahip LAB suşları, besin zincirine karışabilir ve gıdayla ilişkili bağırsak patojenik organizmalara gen aktarımı olasılığını artırır. LAB'nin fermantasyonuyla oluşan fermente gıda ürünlerinde lezzetin oluşmasında üç yol mevcuttur (Hussain *et al.* 2021; Motey *et al.* 2021; Suyabatmaz *et al.* 2022):

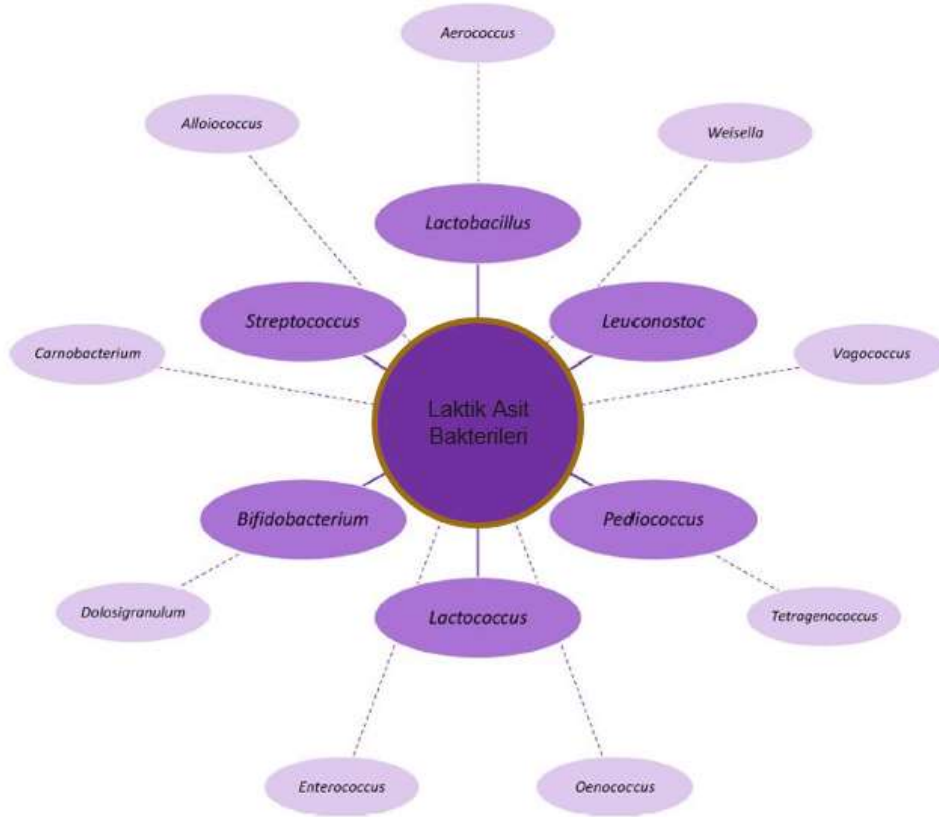
1. Glikoliz (şekerlerin fermantasyonu)
2. Lipoliz (yağın bozunması)
3. Proteoliz (proteinlerin bozunması)

Karbonhidrat metabolizması sonucu üretilen ana ürün laktattır. Ara ürün olan pirüvat ise; diasetil, asetoin, aetaldehit veya asetik aside (bazıları tipik yoğurt tatları için önemli olabilir) dönüştürülebilir. LAB'nin lipolize katkısı oldukça azdır, fakat proteoliz, fermente gıdalarda lezzet oluşumu için anahtar biyokimyasal yoldur.

Bahsedilen bu temel özelliklerden yararlanılarak; LAB cinslerinin sınıflandırılmasının onların Gram reaksiyonuna, morfolojilerine, glikoz fermantasyon moduna, belirli sıcaklıklarda büyüme ve şeker kullanım aralıklarına, çeşitli fermente edilebilir karbonhidratlardan laktik asit üretimine dayandığı belirlenmiştir. LAB'nin tanımlanmasında fenotipik yöntemler oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Sonraki zamanlarda bu yöntemlerin yanısıra suşların daha tutarlı ve doğru bir şekilde tanımlanması için 16S rRNA dizi analizleri geliştirilmiştir. 16S rRNA dizi analizi, günümüzde LAB izolatlarının tür tayini için basit bir yol olarak kullanılmaktadır. Dizi analizlerine de ek olarak tanılama işlemlerinde yeni metodlar geliştirilmiştir. Örneğin; nükleik asit araştırma teknikleri, polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak kısmi rRNA gen dizilemesi ve çözünür protein modelleri bu metodlar arasında sayılabilir (Kang *et al.* 2018; Breyer *et al.* 2021; Bamgbose *et al.* 2022).

Tüm bu bahsedilen tanılama metodlarına göre LAB temelde *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Streptococcus* gibi dört ana cinsten oluşmaktadır. Fakat son taksonomik veriler bu cinslere yeni cinsler eklenmesini öngörmüş ve son yıllarda yapılan taksonomik çalışmalara göre LAB; *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella*,

Lactobacilli ve *Carnobacteria* cinslerinden meydana gelmektedir (Bindu and Lakshmidhevi 2021; Steiner and Lorentz 2021) (Şekil 1).



Şekil 1. Son sistematik verilere göre LAB cinsleri (modifiye edilmiştir) (Garbacz *et al.* 2022)

Laktik Asit Bakterilerinin Metabolizmaları

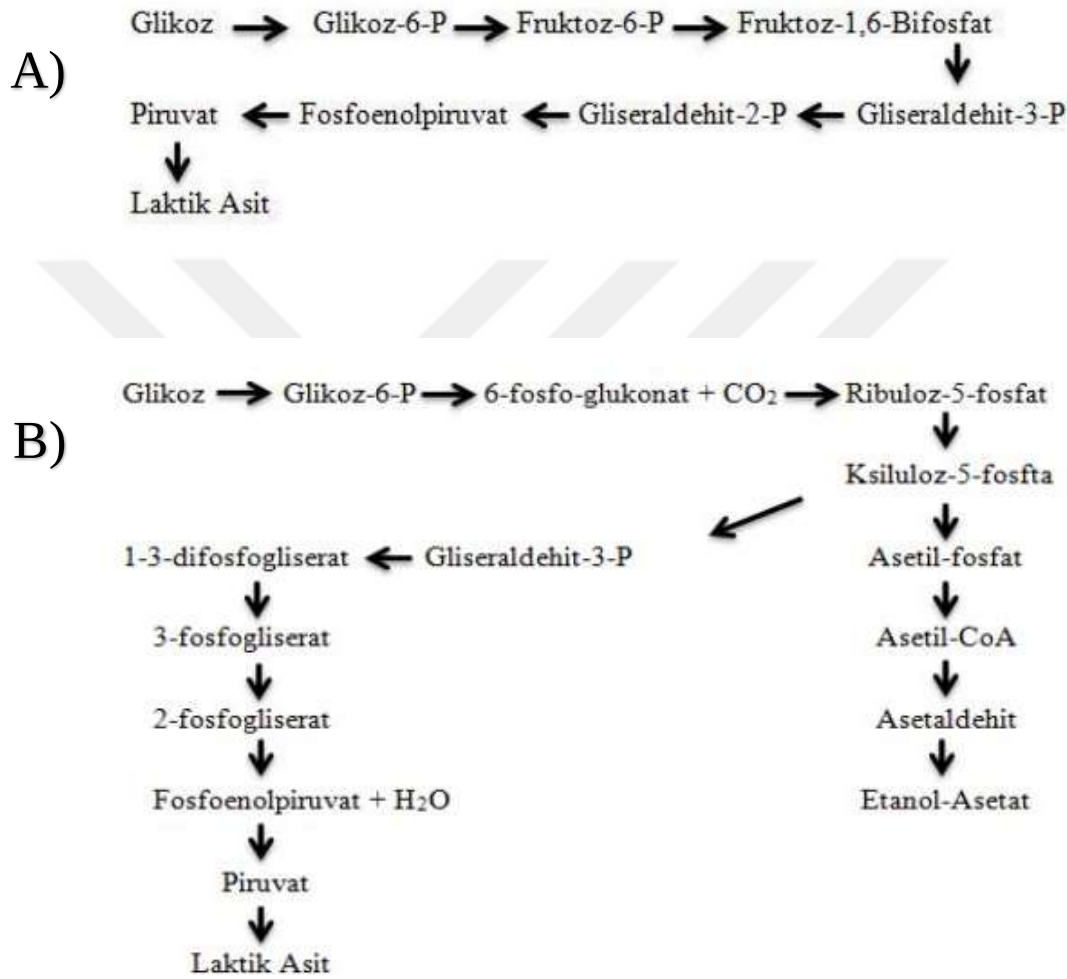
Laktik asit bakterileri kemotrofiktir ve metabolizmalarındaki şeker oksidasyonu, temel enerji üretim yolunu oluşturur. LAB' nin özellikle *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* cinsleri, homofermentatif veya heterofermentatif olarak şekerleri asimile etmektedir (Dos Santos Leandro *et al.* 2021).

LAB'nin homofermentatif metabolizması

Homofermentatif bakteriler, kullandıkları şekerlerin neredeyse tamamını, özellikle de glikozu laktik aside dönüştürürler. Homofermentatif yol, glikoliz reaksiyonlarının birinci fazını içerir. Terminal elektron alıcısı ise laktik aside indirgenen piruvattır. Fermantasyonda piruvat, etanole indirgenerek dekarboksile edilir (Kouitchou Mabeku *et al.* 2020).

LAB'nin heterofermentatif metabolizması

Leuconostoc cinslerini özellikle içeren heterofermentatif yolu kullanan bakteriler, bunun için pentoz fosfat yolunu kullanır. Bu yolda glikoz, riboz 5-fosfata oksitlendiğinde NADPH üretilir. Bu beş karbonlu şeker ve türevleri, ATP, CoA, NAD⁺, FAD, RNA ve DNA gibi önemli biyomoleküllerin bileşenleridir. Bu yol sitozolde meydana gelir (Góral *et al.* 2018; Shi *et al.* 2019) (Şekil 2) .



Şekil 2. Homofermantatif (A) ve heterofermentatif metabolizma (B) (Suişa *et al.* 2022)

Laktik Asit Bakterilerinin Uygulama Alanları

Fermente gıdalar için starter kültür olarak kullanılma

Fermente gıdalar, şekerlerin LAB tarafından fermente edilmesi sonucu oluşmaktadır. Fermente ürün oluşumu çoğunlukla başlatıcı kültür denilen mikroorganizmalara ihtiyaç duyarlar. Bu mikroorganizmalar 'starter bakteri', 'laktik kültür', 'starter kültür' veya 'starter laktik asit bakterisi (LAB)' şeklinde ifade edilebilir. Starter LAB laktozdan, laktik asit üreterek fermente ürün üretiminde başlatıcı kültür olma özelliğini üstlenirler. Starter kültür olarak

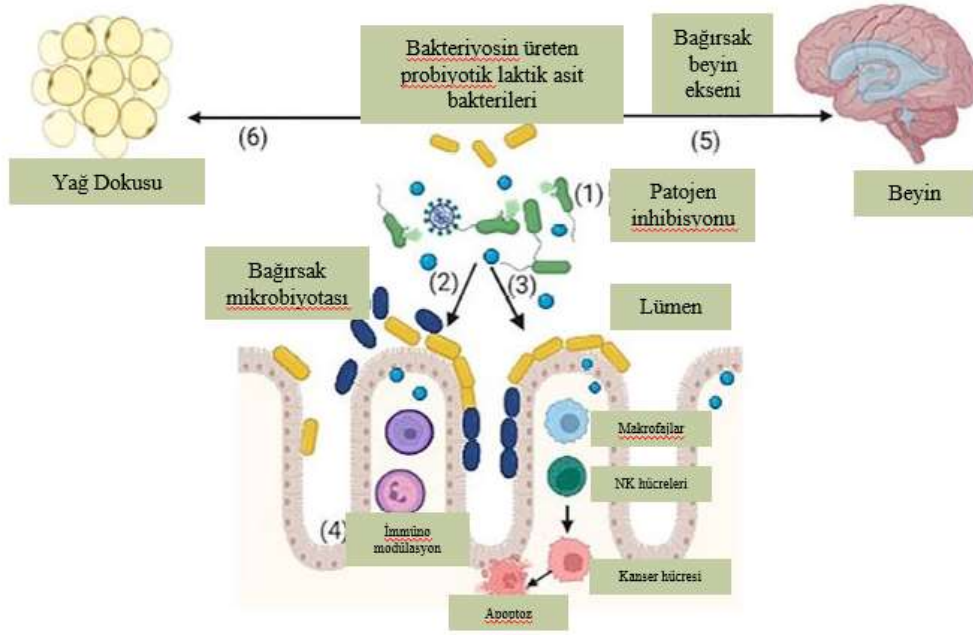
kendine kullanım alanı bulan LAB' nin temel görevi; glikoliz ile sütü asitlendirerek, pH değerini düşürmektir. pH değerindeki düşüş fermente ürün üretiminde, koagülasyon sırasında rennet aktivitesi için gerekli bir unsurdur ve düşük pH fermente süt ürünlerinde bu ürünün olgunlaşmasını hızlandırarak hücre lizisini de etkiler (Hatti-Kaul *et al.* 2018; Er *et al.* 2019). Starter kültür olarak kullanılan LAB, gıda endüstrisinde kendine oldukça önemli bir yer bulan ve insan sağlığına zarar vermeyen hatta fermentasyon sürecinde insan sağlığına faydalı etkiler gösteren mikroorganizmalardır (Jin *et al.* 2021; Steinberg *et al.* 2022). Starter kültür olarak kendine kullanım alanı bulan LAB' nin temel fonksiyonları şunlardır:

- Laktik asit oluşturmak
- Asitliği arttırmak
- pH'ı düşürmek
- Tat, aroma ve tekstürde iyileşme sağlamak

LAB' nin starter olarak bulundukları fermente ürünlerin büyük bir kısmını; peynir, yoğurt, fermente sütler gibi süt ürünleri ve fermente et ürünleri oluşturmaktadır. Bunların yanısıra fermente balık ürünleri, salamura sebze, zeytin ve çok çeşitli tahıl ürünleri de günümüzde starter kültürler kullanılarak üretilmektedir (Hossain *et al.* 2021; Margalho *et al.* 2021).

Biyo koruyucu kültürler olarak kullanılma

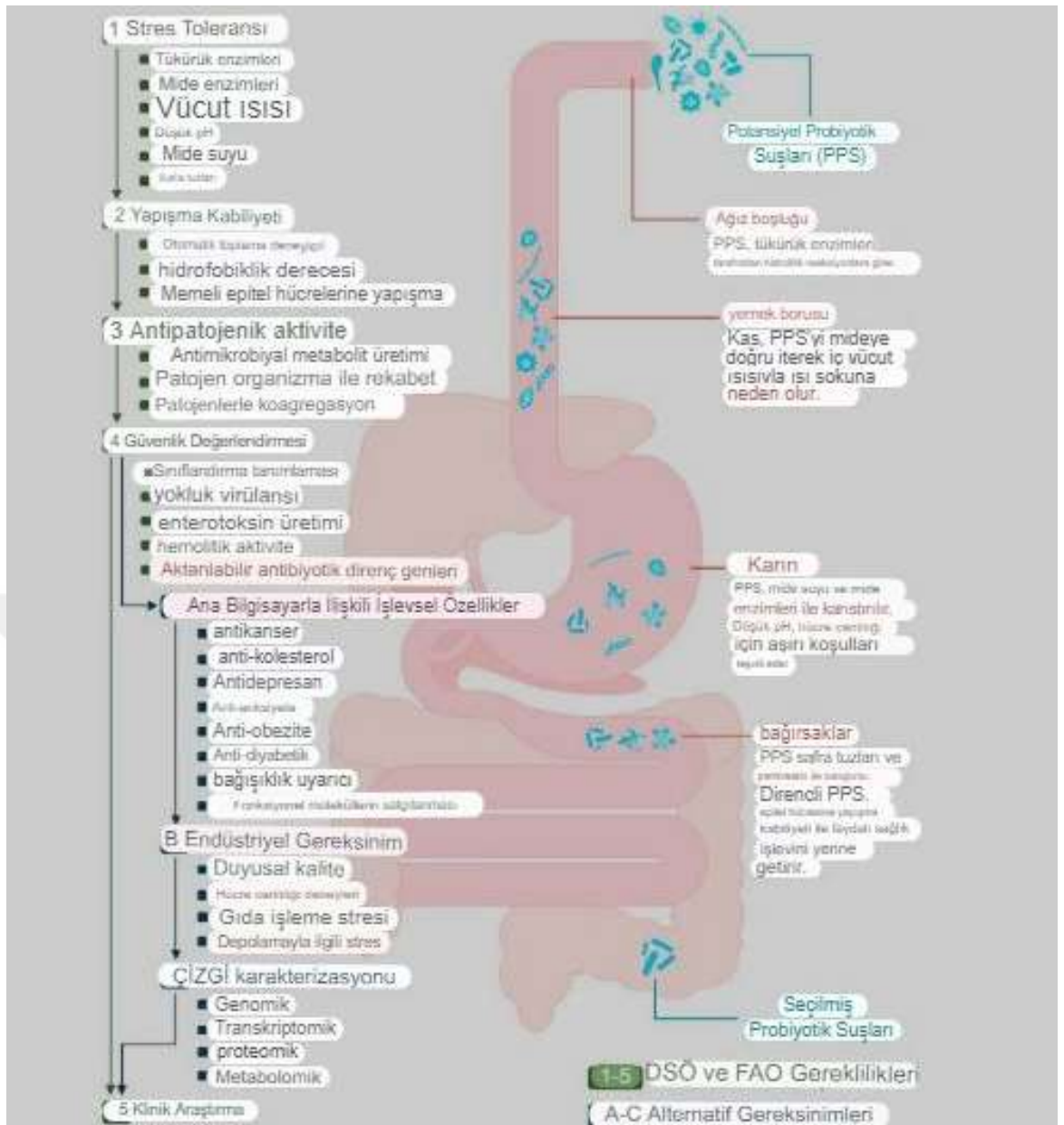
LAB tarafından üretilen en önemli bileşikler; ribozomal olarak sentezlenen ve diğer bakteriler üzerinde bakteriyosidal veya bakteriyostatik etkiye sahip polipeptitler olan bakteriyosinlerdir. Bakteriyosinler, hücre duvarı biyosentezini inhibe etme veya gözenek oluşturma yoluyla hücre zarını bozarak hücre ölümüne yol açmaktadır (Şekil 3). Özellikle gıda bozulmalarında gıda patojenlerinin inhibisyonunu önleyen bakteriyosinler, gıda fermentasyonunda LAB' ni önemli bir noktaya taşımaktadır (Gupta *et al.* 2018; Menezes *et al.* 2018). Gıda fermentasyonunda da en iyi bilinen bakteriyosin özellikle işlenmiş peynir, süt ürünleri ve konserve gıdalarda gıda katkı maddesi olarak kullanılan nisin'dir. Gıda fermentasyonunda patojenik bakterilerin kontrolü oldukça önemli olan LAB' nin aynı zamanda antifungal aktiviteleri de mevcuttur. Bunun yanısıra LAB; antimikotoksinojenik metabolitler üreterek veya bunları absorbe ederek mantar mikotoksinlerini azaltma yeteneğine de sahiptir. LAB'nin biyo koruyucu başlatıcı kültürler olarak kullanılabilmesi için, bir dizi fiziksel ve biyokimyasal özelliklere ve en önemlisi, belirli gıda ortamında gösterilmesi gereken büyüme ve yeterli antimikrobiyal metabolit üretimi sağlama yeteneğine sahip olmaları gerekir (Moreno *et al.* 2018; Grujović *et al.* 2019).



Şekil 3. Bakteriyosin üreten LAB’ nin potansiyel fonksiyonları (modifiye edilmiştir) (Anjana and Tiwari 2022)

Probiyotik kültürler olarak kullanılma

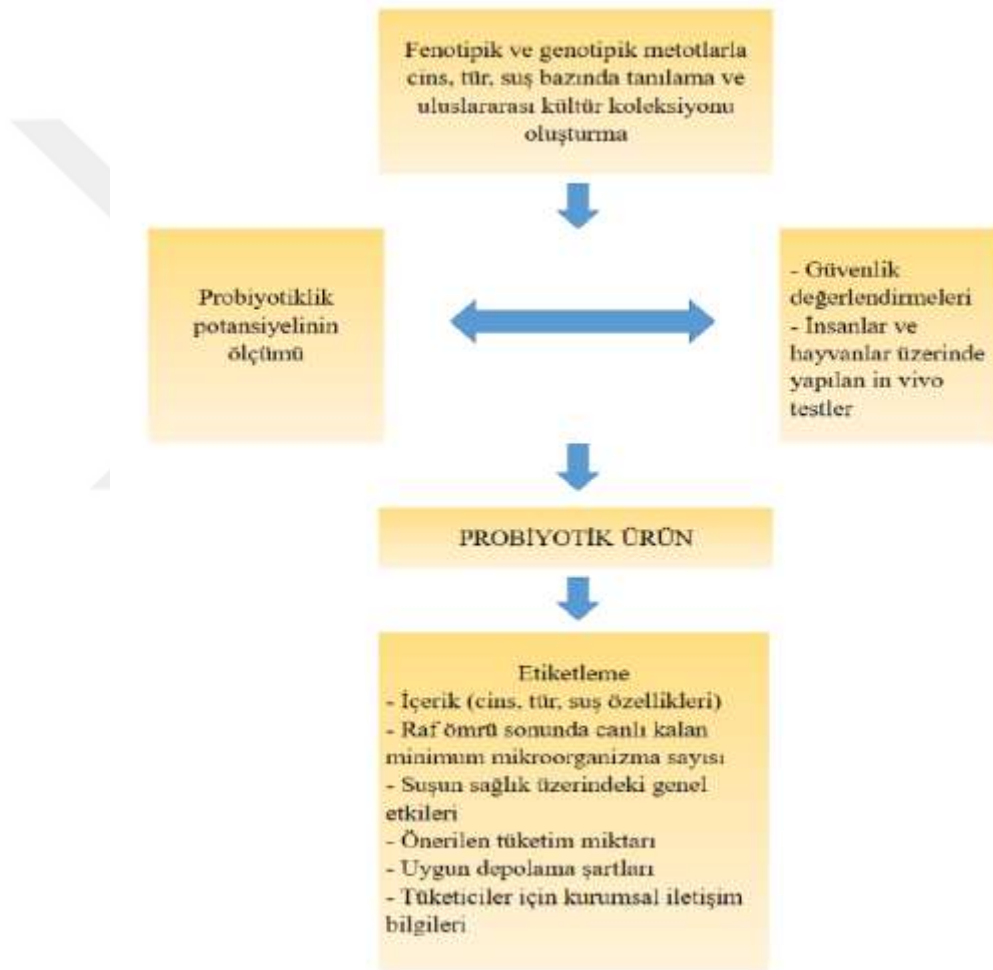
19. yüzyılın sonlarında doğal gastrointesitinal sistemin mikroflorasının tanımlanması, bu mikrofloranın sağlıklı bireylerin gastrointestinal sisteminde hastalıklı bireylerden daha fazla bulunduğu tespit edilmesi, “probiyotik” terimin ortaya çıkmasına sebep olmuştur. World Health Organization (WHO) ve Food and Agriculture Organization (FAO) uzmanları tarafından “probiyotik” terimi resmi olarak şu şekilde tanımlanmıştır: “Probiyotikler, yeterli miktarlarda uygulandığında konakçıya sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalardır”. Bu tanımdan yola çıkılarak şu çıkarım yapılabilir: “Probiyotikler, gastrointestinal sistemin mikroflorasını düzenleyerek ve bağırsak homeostazını sürdürmek için immünomodülatör etkiler uygulayarak bağırsak bağışıklığını iyileştiren canlı gıda katkılarıdır” (Vasiee *et al.* 2018; Sjöfjan *et al.* 2021) (Şekil 4).



Şekil 4. WHO/FAO'ya göre probiyotik suşların karakterizasyonu (modifiye edilmiştir) (de Melo Pereira 2018)

LAB bağırsak mikrobiyotasının bir parçası olarak, biyojenik aminler ve alerjenik bileşikler gibi çeşitli substratları kısa zincirli yağ asitlerine, diğer organik asitlere ve gazlara fermente eder. Probiyotikler, fermente yiyeceklerin ve içeceklerin fonksiyonel gıda bileşenleri olarak bilinmektedir. Fermente gıdalarda bulunan ve probiyotik denilen LAB' nin potansiyel probiyotik mikroorganizma olabilmesi için; asit ve safra kararlılığına, sindirim enzimlerine karşı direnç mekanizmasına, bağırsak yüzeyine tutunma kapasitesine, antagonistik aktiviteye, kolesterol düşürücü etkiye, inflamatuvar etkiler olmadan bağışıklık sistemini uyarma özelliğine sahip olması gerekir. Fermente gıdalarda bulunan ve bahsedilen tüm bu özellikleri barındıran probiyotik mikroorganizmalar, dengeyi sağlayabilen mikroorganizmalardır. Yeterli miktarlarda alınan probiyotiklerin konak bağışıklığının artırdığı, laktoz intoleransını azalttığı, ishal

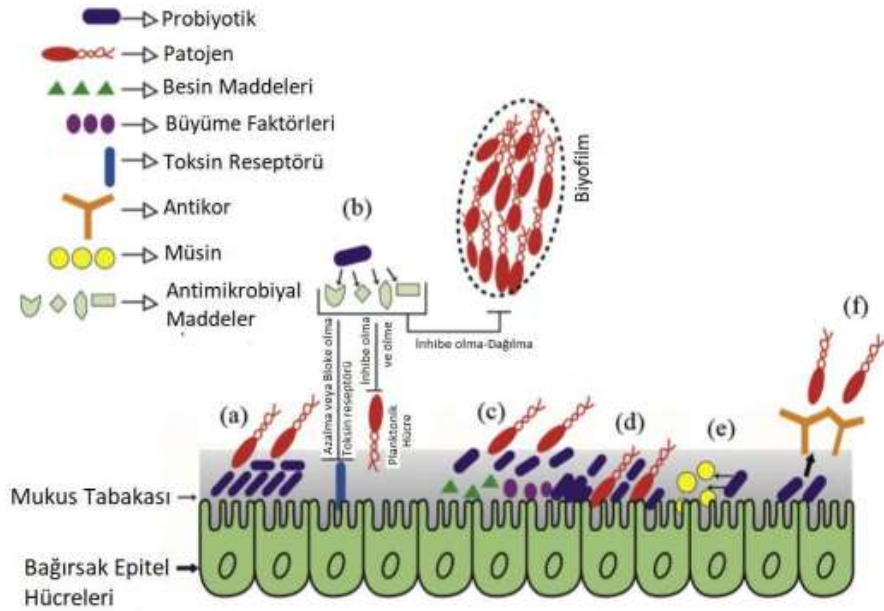
epizodlarının insidansını azalttıkları ve oksidatif strese karşı koruma sağladıkları görülmüştür. Probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmaların insanların doğrudan alabilmesi açısından güvenli olması gerekmektedir (van Zyl *et al.* 2020; Güney and Güngörmüşler 2021; Mansilla *et al.* 2022). Probiyotiklerin güvenilir olması ile ilgili en önemli endişelerden bir tanesi, virülans potansiyellerinin ve antimikrobiyal direnç için kaynaklarının olması olasılığıdır. Probiyotik mikroorganizmaların canlılıklarını sürdürebilmesi ve insan kolonu üzerinde kolonize olabilmesi için gastrointestinal sistemden geçişte muhakkak hayatta kalmaları gerekmektedir (Barzegar *et al.* 2021) (Şekil 5).



Şekil 5. WHO' ya göre probiyotik ürün geliştirmek için takip edilecek genel basamaklar (modifiye edilmiştir) (van Zyl *et al.* 2020)

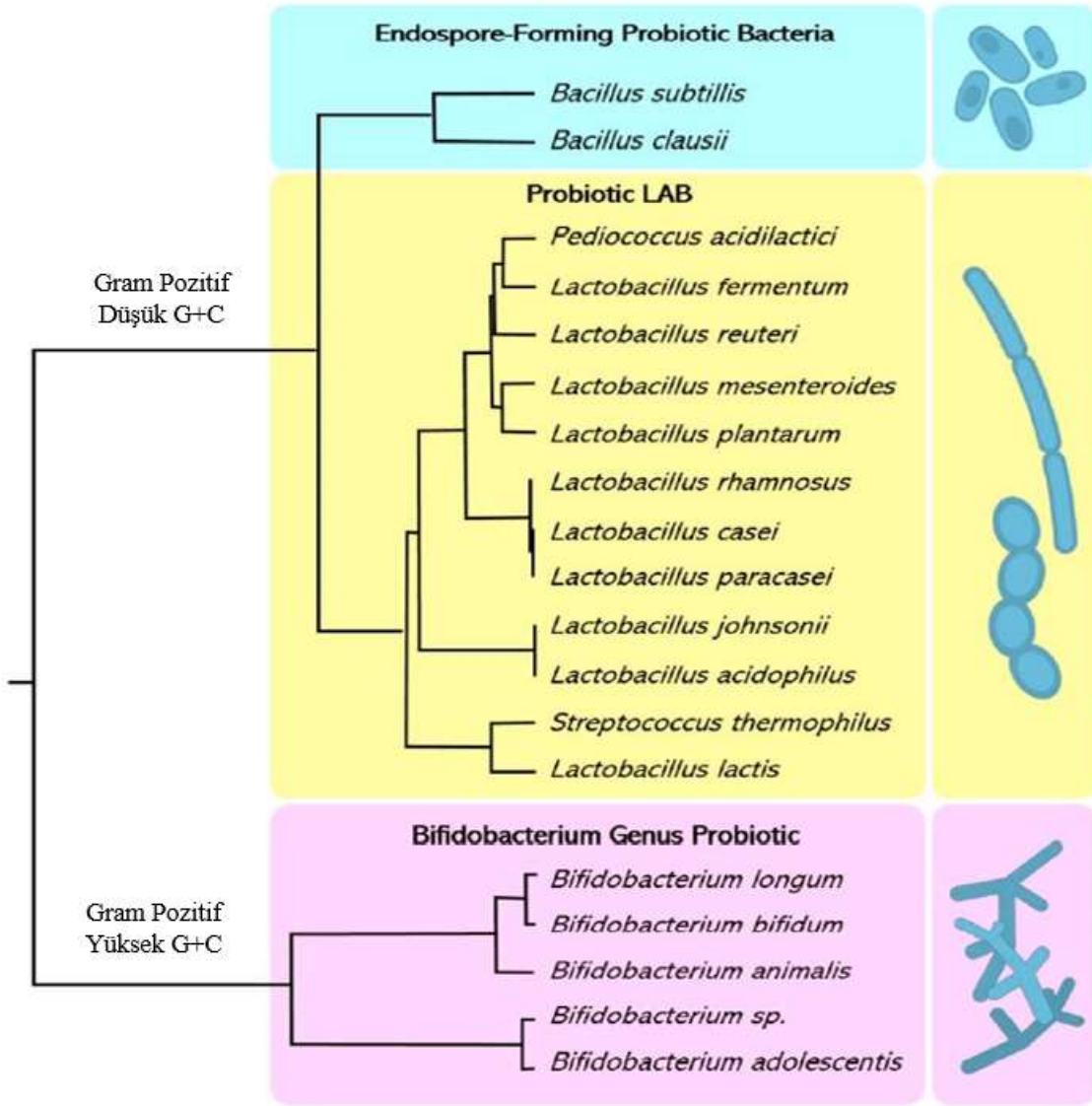
Probiyotik mikroorganizmalar, yararlı ve zararlı mikrobiyota sayısını dengeleyerek sindirim sistemindeki mikrobiyal popülasyonu dengede tutmaktadır. Ürettikleri organik asitler ve bakteriyosinler gibi antimikrobiyal maddeler sayesinde patojenlerin büyümesini engeller ve ortamın pH değerini patojen bakteriler için öldürücü bir düzeye düşürür. Patojen bakterilerle mücadele noktasında probiyotikler ayrıca; bağırsak epiteline yapışarak, patojenik bakterilerin

iletişim süreçlerine müdahale ederler. Literatür verilerine göre; probiyotik mikroorganizmaların kullanımı; hayvanların bağışıklık sisteminin spesifik olmayan bir şekilde uyarılmasını da sağlamaktadır (Zoumpopoulou *et al.* 2018; Fekri *et al.* 2020). Probiyotik bakterilerin fonksiyonel özellikleri ile ilgili yapılan literatür taramalarında probiyotiklerin ayrıca; kanseri önleyici antikanser etkiye de sahip oldukları bildirilmiştir. Probiyotikler, lümen pH'sını düşürerek, besinler için rekabet eder ve epitel hücrelerinin yüzeyine yapışarak patojenleri antagonize ederler. Bulaşıcı hastalıkların önlenmesi, kandaki normal insülin seviyelerinin korunması, serum kolesterolünün düşürülmesi, besinlerin sentezlenmesi ve biyoyararlanımı, gıda koruma ve fermentasyon gibi yararlı etkilere sahip olan probiyotik LAB ayrıca, *Helicobacter pylori* ile ilişkili peptik ülser, laktoz emilim bozukluğu, ishal, genital ve idrar yolu enfeksiyonları, alerjik reaksiyonlar, kolon kanseri gibi çok çeşitli hastalıkların tedavisinde de oldukça önemlidir (Dowarah *et al.* 2018; Hasan *et al.* 2022) (Şekil 6).



Şekil 6. Laktik asit bakterilerinin (LAB) bağırsak yolu üzerindeki probiyotik etkisi (modifiye edilmiştir) (Deng *et al.* 2021)

Probiyotik potansiyelli bakteri içeren fermente gıdalardaki tespit edilen en önemli probiyotik bakteri cinsleri; *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Propionibacterium* spp., *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* ve *Pediococcus* cinslerine ait türlerdir. *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. reuteri*, *Lb. rhamnosus* ve *Lb. plantarum*, probiyotik içeren fonksiyonel gıdalarda en çok kullanılan LAB'dir (Ringø *et al.* 2020) (Şekil 7).



Şekil 7. Probiyotik bakteri gruplarının filogenetik ilişkisi (modifiye edilmiştir) (de Melo Pereira 2018)

KURAMSAL TEMELLER

Sunulan tezin planlanmasında, laboratuvar çalışmaları ve tezin yazım aşamalarında faydalanılan literatürlerin özetleri tarih sırasına göre aşağıda verilmiştir.

Park *et al.* (2019) tarafından yapılan bir çalışmada; *Lactobacillus plantarum* SPC-SNU 72-2 suşunun ekşi hamur fermentasyonunda hem probiyotik hem de starter kültür olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bu kapsamda özellikle belirtilen suşun başlatıcı olarak kullanılabilmesi için probiyotik potansiyelli ve gıda güvenliği açısından uygun olması gerektiği düşünülmüştür. Belirtilen suşun probiyotik olma potansiyeli araştırılırken öncelikle hemolitik aktivitesine ve biyojenik amin üretim potansiyeline bakılmıştır. Gıda güvenliği açısından başlatıcı kültür olarak kullanılabilmesi için suşun, β -hemolitik olmaması ve biyojenik amin üretiminden sorumlu bazı genleri (hdc, tdc ve ldc) içermemesi beklenmiştir. Elde edilen veriler incelendiğinde *Lactobacillus plantarum* SPC-SNU 72-2 suşunun; β -hemolitik olmadığı, biyojenik amin üretimi için gerekli genleri içermediği, gastrointestinal koşullara (gastrik asit, safra tuzu) direnç gösterebildiği ve kolon epitel hücrelerine oldukça başarılı kolonizasyon gösterdiği görülmüştür. Sonuç olarak *Lactobacillus plantarum* SPC-SNU 72-2 suşunun gıda güvenliği açısından fermentasyonda kullanılabilecek uygun bir probiyotik bakteri olabileceği sonucuna varılmıştır.

Wei *et al.* (2019) tarafından Çin'deki soğuk su balıklarının bağırsak yolundan izole edilen soğuğa adapte olmuş *Lactobacillus* suşlarının, antimikrobiyal aktiviteleri ve *in vitro* özellikleri araştırılmıştır. Bu kapsamda; 43 adet *Lactobacillus* ile çalışılmıştır. 16S rRNA sekans analizi ile *Lactobacillus* türleri tanımlanmıştır. *In vitro* özelliklerinin belirlenmesi kapsamında izolatların hemolitik aktivitelerine, düşük pH' ya ve safra tuzlarına olan dirençlerine, antimikrobiyal aktivitelerine ve antibiyotik direnç profillerine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; 22 adet izolatın, 6 farklı gıda patojenine karşı geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivite gösterdiği, 4 adet *Lactobacillus* (2 adet *Lactobacillus sakei* ve 2 adet *Lactobacillus plantarum*) suşunun pH 2' de en yüksek düzeyde hayatta kalma kabiliyeti gösterdiği, yine bu dört suşun %2 oranında safra tuzu bulunduran ortama yüksek tolerans gösterdiği, hemolitik aktivitelerinin olmadığı görülmüştür. Sonuç olarak 43 *Lactobacillus* izolatın 3 adetinin gıda koruyucu ve probiyotik katkı maddesi olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

de Souza *et al.* (2019) tarafından yapılan bir çalışmada; Mozzarella peynirinden izole edilen *Lactobacillus casei* ve *Lactobacillus fermentum* suşlarının, probiyotik potansiyeli, gıda güvenilirliği ve gastrointestinal sistem koşullarındaki canlılıkları belirlenmeye çalışılmıştır. Bu

kapsamda belirtilen türlerin, otoagregasyon ve koagregasyon yetenekleri, hidrofobiklik yeteneği, β -galaktosidaz üretimi, gastrointestinal koşullarda (GIT) hayatta kalma yetenekleri antibiyotik duyarlılıkları, virülans faktörleri ve biyojenik amin üretimleri test edilmiştir. Elde edilen verilere bakıldığında; her iki türün de LAB ve/veya patojenlerle birlikte agregasyon yeteneği gösterdiği, her iki türün de düşük hidrofobiklik değerleri gösterdiği, 7 adet *Lactobacillus casei* ve 6 adet *Lactobacillus fermentum* suşunun β -galaktosidaz ürettiği, hemen hemen hepsinin gastrointestinal koşullarda hayatta kalabildiği, yine tüm suşların vankomisin ve kanamisine dirençli olduğu, özellikle *L. casei* SJRP38 ve *L. fermentum* SJRP43 suşlarının virülans faktör genlerini içermediği ve tüm bu sonuçlara dayalı olarak bu iki suşun yüksek probiyotik potansiyelli bakteriler olduğu görülmüştür.

Song *et al.* (2019) tarafından yapılan bir çalışmada; Kimchi'den izole edilen yeni *Lactobacillus brevis* KCCM 12203P suşunun probiyotik ve antioksidan özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda belirtilen suşun probiyotik potansiyelli olup olmadığını anlamak amacıyla suşun pepsin ve safra tuzuna direnci, HT29 hücrelerine tutunma kapasitesi ve β -galaktosidaz üretim potansiyeli belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen verilere bakıldığında; *L. brevis* KCCM 12203P' nin 2,5 pH değerindeki %0,3' lük pepsine ve %0,3 oranındaki safra tuzuna karşı güçlü tolerans gösterdiği, HT29 hücrelerine % 68,4 oranında güçlü bir tutunma kapasitesi gösterdiği ve yüksek miktarlarda lösin arilamidaz, valin arilamidaz, β -galaktosidaz ve N-asetil- β -glukozaminidaz ürettiği görülmüştür. Yüksek antioksidan kapasiteye de sahip olan *L. brevis* KCCM 12203P' nin etkili probiyotik bakteri olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Abouloifa *et al.* (2020) tarafından yapılan bir çalışmada; geleneksel fermente yeşil zeytinlerden izole edilen antifungal *Lactobacillus* suşlarının probiyotik özellikleri ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bu amaçla *Lactobacillus* suşlarının %0.3' lük safra ortamına ve pH 2,5 gibi düşük pH' lı ortamlara direnci tespit edilmiştir. Ayrıca suşların antifungal, antibakteriyel özellikleri, β -galaktosidaz üretim potansiyelleri, otoagregasyon, hidrofobiklik, antioksidan aktiviteleri ve hemolitik aktiviteleri belirlenmiştir. Elde edilen veriler incelendiğinde; beş adet *Lactobacillus brevis*, iki adet *Lactobacillus pentosus* ve yedi adet *Lactobacillus plantarum* suşunun sırasıyla safra tuzuna ve düşük pH' ya olan dirençlerinin %83,19 - %64,44 olduğu görülmüştür. Suşların otoagregasyon, hidrofobiklik, antioksidan aktiviteleri ve yüzey gerilimi değer aralıklarının ise sırasıyla %10.29–41.34, %15.07–34.67, %43.11–52.99 ve 36.23–40.27 mN/m değerinde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca çeşitli gıda patojenlerine karşı etkili bir biçimde (11,2-16,4 mm) antifungal ve antibakteriyel etki gösterdikleri görülmüştür. Hemoliz ve jelatinaz aktivitesi olmayan suşların β -galaktosidaz üretim potansiyelinin olduğu ve bu bağlamda eldeki suşların

hem probiyotik olarak kullanılabilme, hem başlatıcı kültür olabilme, hem de ilaç endüstrilerinde biyokoruyucu kültür olarak kullanılabilme potansiyellerinin olduğu sonucuna varılmıştır.

Romero-Luna *et al.* (2020) tarafından yapılan bir çalışmada; kefir tanelerinden (Tibicos) izole edilen *Lactobacillus paracasei* CT12'nin probiyotik potansiyeli çalışılmıştır. Bu kapsamda belirtilen suşun probiyotik potansiyelinin ortaya konulabilmesi için; gastrointestinal koşullarda hayatta kalabilirliği, antibiyotik direnç profilleri, hemolitik aktiviteleri, antimikrobiyal, antifungal ve antioksidan özellikleri tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında *Lactobacillus paracasei* CT12'nin, gastrointestinal koşullarda %57 oranında hayatta kalabildiği görülmüştür. Hemolitik kapasiteye sahip olmayan *Lactobacillus paracasei* CT12'nin ampisilin ve eritromisine duyarlı olduğu, antimikrobiyal, antifungal ve antioksidan özellik gösterdiği tespit edilmiştir.

Cheon *et al.* (2020) tarafından yapılan bir çalışmada; Kore fermente gıdalarından izole edilen *Lactobacillus buchneri* KU200793'ün probiyotik özellikleri ve nöroprotektif etkileri ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bu bağlamda özellikle *Lactobacillus buchneri* KU200793'ün probiyotik özellikleri incelendiğinde; belirtilen suşun, yapay mide suyuna ve safra tuzlarına karşı yüksek tolerans, antibiyotiklere duyarlılık, kanserojen enzimler üretmeme ve bağırsak hücrelerine yüksek tutunma kapasitesi gibi potansiyel probiyotik özellikler gösterdiği gözlemlenmiştir.

Oldak *et al.* (2020) tarafından yapılan bir çalışmada; Polonya bölgesel peynirlerinden izole edilen *Lactobacillus plantarum* suşlarının anti-stafilokokal aktivitesi ve probiyotik özellikleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde; *Lactobacillus plantarum* suşlarının özellikle *Staphylococcus aureus*'un büyümesini önemli derecede ($2,8 \text{ mm} \pm 1,2$) inhibe ettiği ve gastrointestinal koşullarda hayatta kalma oranının yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu bağlamda da çalışılan *Lactobacillus plantarum* suşlarının gıda endüstrisinde koruyucu kültür olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Sornsenee *et al.* (2021) tarafından yapılan bir çalışmada; fermente hurma öz suyundan izole edilen *Lactobacillus* türlerinin probiyotik özellikleri incelenmiştir. Çalışma kapsamında toplamda 40 adet LAB izole edilmiş ve bunlardan 10 tanesinin antimikrobiyal aktivite göstermesiyle çalışmaya bu 10 adet izolatla devam edilmiştir. 16S rRNA dizi analizi ile bu 10 adet izolatın 8 tanesinin *Lactobacillus paracasei*, 1 tanesinin *Lactobacillus fermentum* ve 1 tanesinin de *Lactobacillus brevis* olduğu belirlenmiştir. Elde edilen veriler incelendiğinde; izolatların hepsinin düşük pH, pepsin, pankreatin ve safra tuzları dahil olmak üzere simüle edilmiş gastrointestinal sistem koşullarına karşı toleranslı oldukları, güçlü otoagregasyon özelliklerinin olduğu, hücre yüzeyi hidrofobikliğini korudukları ve insan bağırsak epitel

hücrelerine sıkıca tutundukları gözlemlenmiştir. Yine izolatların hepsinin ampisilin, eritromisin, klindamisin, tetrasiklin ve kloramfenikol'e duyarlı, vankomisin, kanamisin ve streptomisin'e dirençli olduğu görülmüştür. Ayrıca izolatların hiçbirinin hemolitik aktivite göstermediği ve dokuz patojenik bakteriye karşı iyi antibakteriyel aktivite sergiledikleri de rapor edilmiştir.

Kunduhoglu ve Hacıoglu (2021) tarafından yapılan bir çalışmada; *Lactobacillus brevis* KT16-2'nin probiyotik potansiyeli ve gluten hidroliz aktivitesi araştırılmıştır. Probiyotik bakterilerin çölyak hastası bireylerde gluteni hidroliz edebilme yeteneğinden yola çıkılarak planlanan çalışmada ilk aşama belirtilen suşun probiyotik olma potansiyeli araştırılmıştır. Elde edilen veriler incelendiğinde; belirtilen suşun pH 2-8 gibi oldukça geniş bir pH aralığında, % 0.3-1 konsantrasyona sahip safra tuzunda hayatta kalabildiği, antibiyotik duyarlılığının ve antimikrobiyal aktivitesinin güçlü olduğu, %59.4 oranında otoagregasyon yeteneğine, %52.7 oranında ise yüzey hidrofobikliğe sahip olduğu gözlemlenmiştir. Probiyotik potansiyeli güçlü olduğu belirlenen *Lactobacillus brevis* KT16-2'nin daha sonra güçlü antioksidan yeteneği ve gluteni hidroliz etme yeteneğinin de güçlü olduğu sonucuna varılmıştır.

Mann *et al.* (2021) tarafından yapılan bir çalışmada; potansiyel probiyotik özellikleri taşıyan *Lactobacillus Fermentum* OK'nin izolasyonu, karakterizasyonu ve biyogüvenlik açısından değerlendirmesi yapılmıştır. Bu kapsamda; ilk aşamada biyogüvenlik açısından önemli bir kıstas olan patojenlere karşı antagonistik etki gösterme açısından izolatlar incelenmiştir. Sonuç olarak da *Lactobacillus fermentum* OK'nin özellikle gıda patojeni olarak bilinen *S. aureus*' u %60 oranında öldürdüğü bildirilmiştir. Sonrasında ise; belirtilen suşun biyojenik amin üretimi, hemolitik aktivitesi, antibiyotik duyarlılığını tespit etmek amacıyla yapılan çalışmalar neticesinde *Lactobacillus Fermentum* OK'nin güçlü bir probiyotik bakteri olduğu ve biyogüvenlik açısından önemli bir noktada olduğu sonucuna varılmıştır.

Ait Chait *et al.* (2021) tarafından yapılan bir çalışmada; Cezayir geleneksel peynirlerinden izole edilen *Lactobacillus brevis* suşlarının antipatojenik ve probiyotik potansiyeli araştırılmıştır. Çalışma kapsamında; Cezayir ev yapımı peynirlerinden izole edilen 98 adet *Lactobacillus* suşundan 14'ünün (B1-B14) *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* a karşı antagonistik etki sergiledikleri görülmüş ve çalışma bu 14 izolat üzerinden yürütülmüştür. İzolatların gastrointestinal koşullara dirençleri, hücre yüzey özellikleri, bağırsak epitel hücrelerine tutunma kabiliyetleri, kolesterolü düşürme yetenekleri ve antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. Elde edilen veriler incelendiğinde; 5 adet izolattan (B9, B13, B18, B19 ve B38), 16s rRNA dizi analizi neticesinde yalnızca 3 adet izolatın (B9, B13 ve B38) *Lactobacillus brevis* olarak tanımlandığı, bu izolatların da pankreas suyuna, safra tuzlarına ve asidik sıvılara karşı yüksek

tolerans gösterdiği, yüksek oranda hidrofobiklik seviyesine (87, 92, ve sırasıyla %81), oto-agregasyon (sırasıyla %61, 68 ve %72) ve HT-29 hücrelerine tutunma aktivitesine (sırasıyla %79, 84 ve %74), sahip oldukları gözlemlenmiştir. Ayrıca bu izolatların antioksidan aktivite ve kolesterolü düşürme kabiliyetinin olduğunu bildirmişlerdir.

Pérez *et al.* (2022) tarafından yapılan bir çalışmada; portakal suyunda bulunan baskın laktik asit bakteri mikroflorasını ortaya çıkararak bu izolatların probiyotik potansiyelleri araştırılmıştır. Mikrofloranın belirlenmesi için 16S rRNA sekans analizi yapılmış ve baskın floranın *Levilactobacillus brevis* ve *Lactiplantibacillus plantarum* türlerinden oluştuğu gözlemlenmiştir. Daha sonra bu iki türün probiyotik potansiyelli birer bakteri olarak ileriki çalışmalarda kullanılabilirliği araştırıldığında; her iki türün de patojen bakterilere karşı antagonistik etki gösterdikleri, pH 3 te hayatta kalma oranlarının yüksek olduğu ve gastrointestinal koşullara yüksek direnç gösterdikleri sonucuna varılmıştır.

Mazlumi *et al.* (2022) tarafından yapılan bir çalışmada; tuzlu su balığı örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve probiyotik potansiyellerinin karakterizasyonu amaçlanmıştır. Bu kapsamda öncelikle tuzlu su balıklarının bağırsaklarından LAB izole edilmiş ve bu izolatların moleküler olarak identifikasyonu yapılmıştır. Moleküler identifikasyon neticesinde *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactiplantibacillus pentosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Levilactobacillus brevis*, *Pediococcus pentosaceus* ve *Pediococcus acidilactici* türlerine ait 19 adet bakteri elde edilmiştir. 19 adet bakterinin probiyotik potansiyeli araştırılınca; gastrointestinal sistem koşullarında hayatta kaldıkları, agregasyon yüzdesinin $01,3 \pm 0,5$ ile $82,6 \pm 1,4$ arasında, toluen ile hidrofobiklik yüzdesinin $3,7 \pm 1,6$ ile $69,4 \pm 1,3$ arasında, ksilen ile hidrofobiklik yüzdesinin ise $02,2 \pm 1,6$ ile $56,4 \pm 2,1$ arasında değişkenlik gösterdiği görülmüştür. Tüm izolatların klinik antibiyotiklere karşı değişken duyarlılık ve direnç gösterdikleri ve 8 enterik patojenin tümüne karşı da antimikrobiyal aktivite gösterdikleri gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak da tuzlu su balıklarındaki LAB'nin probiyotik potansiyelli bakteriler olduğu sonucuna varılmıştır.

Shazadi ve Arshad (2022) tarafından yapılan bir çalışmada; vajinal mikrofloradan izole edilen laktik asit bakterilerinin inhibitör ve probiyotik özellikleri değerlendirilmiştir. Çalışma kapsamında sağlıklı kadınların vajina duvarından alınan örneklerden toplamda 43 adet LAB izole edilmiş ve bu izolatların öncelikle antimikrobiyal karakterlerine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre çalışılan suşların *E. faecalis* (JH-86), *S. aureus* (JH-68), *Streptococcus* sp. (JH-80) ve *E. coli* (JH-101) üzerinde 9,00 ila 20,33 mm arasında değişen inhibisyon zonları oluşturdukları gözlemlenmiştir. Özellikle *Limosilactobacillus reuteri* (MT180537), *Pediococcus pentosaceus* (MT176555), *Limosilactobacillus pontis* (MW362838) ve

Levilactobacillus brevis'in (MW362790) *E. faecalis*'e (MW051601) karşı önemli bakterisidal etki gösterdikleri görülmüştür. Yine özellikle probiyotik potansiyellerinin ortaya konması amacıyla izolatların gastrointestinal koşullardaki direnç profili aydınlatılmaya çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre bu izolatların çok iyi asit ve safra tuzu dirençlerinin olduğu, yüksek agregasyon potansiyellerinin olduğu ve biyofilm oluşturabildikleri gözlemlenmiştir. Ayrıca belirtilen izolatların antibiyotiklerin çoğuna duyarlı olduğu ve hemolitik aktivite göstermedikleri görülmüştür. Bu bağlamda da çalışılan türlerin probiyotik olarak kullanılabilirliğinin sağlıklı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Rai ve Tamang (2022) tarafından yapılan bir çalışmada; doğal olarak fermente edilmiş inek sütü ve yak sütü ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin probiyotik özelliklerinin *in vitro* ve genetik taraması amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında 22 adet numune çalışılmıştır ve toplamda 272 adet LAB izole edilmiştir. Baskın florayı *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis hordniae*, *Lc. lactis tructae*, *Enterococcus faecalis*, *E. italicus* ve *E. pseudoavium* oluşturmuştur. *In vitro* olarak bu izolatların probiyotik olma potansiyelleri araştırıldığında; pH 3' e, safra tuzuna ve lizozime dirençli oldukları, β -galaktosidaz aktivitesi gösterdikleri, %85'ten fazla hidrofobiklik özelliği gösterdikleri gözlemlenmiştir. Sonrasında ise *in vitro* olarak test edilen bu özelliklerin genetik taraması yapılmıştır. Düşük pH toleransı için *clp L* ve *tdc* kodlayan genlere, safra toleransı için *agu A* ve *Ir1516* kodlayan genlere, BSH aktivitesi için *LBA1446* kodlayan genlere, mukozal bağlanma özelliği için *map A*, *apf*, *mub 1* ve *msa* kodlayan genlere, bakteriyosin üretimi için *mesY* kodlayan genlere bakılmıştır ve her bir geni bu izolatların barındırdığı görülmüştür. Sonuç olarak belirtilen türlerin probiyotik potansiyelli bakteriler olduğu kanıtlanmıştır.

Sugajski *et al.* (2022) tarafından yapılan bir çalışmada; potansiyel antibakteriyel özelliklere sahip yeni laktik asit bakteri kaynaklarının taranması amaçlanmıştır. Bitkisel ve hayvansal kaynaklar taranarak LAB içeriğinin belirlenmeye çalışıldığı çalışmada LAB kaynağı olarak en iyi kaynağının buzağı olduğu bildirilmiştir. Buzağıdan izole edilen LAB' nin, en yüksek proteolitik ve antibakteriyel özellik gösterdiği ve ayrıca bu izolatların yine gastrointestinal mikrobiyotanın en değerli üyeleri olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak elde edilen izolatların potansiyel probiyotik suşlar için umut verici bir kaynak olduğu sonucuna varılmıştır.

Suyabatmaz *et al.* (2022) tarafından yapılan bir çalışmada; bal arısı ile ilişkili laktik asit bakterilerinin insan kullanımı için probiyotik potansiyelleri araştırılmıştır. Çalışmada; toplamda 11 adet suşun morfolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlenerek 16S rRNA sekans analizi ile moleküler olarak tanımlanmıştır. Sonrasında elde edilen suşların antimikrobiyal aktiviteleri, gastrointestinal koşullara karşı toleransı, agregasyon yeteneği gibi ön probiyotik

özellikleri araştırılmıştır. Suşların antimikrobiyal özellikleri, çok çeşitli insan patojenlerine karşı test edilmiştir. γ -hemoliz gösteren ve bakteriyofaj içermeyen tüm suşlar güvenli kabul edilmiştir. %0,3 safra ve 3,0-7,8 pH içeriği için kontrol edilen suşların hayatta kalma olasılığının yüksek olduğu görülmüştür. En yüksek agregasyon oranının 4 saat sonra %14,7 ile %30,76 arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Test edilen LAB suşlarının ayrıca, *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* ile belirgin bir şekilde koagregasyon sergilediği bildirilmiştir.



MATERYAL VE METOD

Kullanılan Kimyasallar

Tablo 2. Tez Dahilinde Kullanılan Kimyasallar, Besiyerleri ve Kitler

KİMYASAL ADI	FİRMA
Distile Su	Sigma-Aldrich
DNA Marker	Sigma-Aldrich
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich
Etidyum Bromür (EtBr)	Sigma-Aldrich
dNTP	Sigma-Aldrich
6X Yükleme Tamponu	Sigma-Aldrich
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma-Aldrich
Kristal Violet	Sigma-Aldrich
Lügol	Sigma-Aldrich
Etanol	Sigma-Aldrich
Safranin	Sigma-Aldrich
Potasyum Hidroksit (KOH)	Sigma-Aldrich
Malaşit Yeşili	Sigma-Aldrich
İmmersiyon Yağı	Sigma-Aldrich
Oksidaz Test Kit	Sigma-Aldrich
Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich
Glikoz	Sigma-Aldrich
Pepsin	Roche
Pankreatin	Roche
Safra Tuzu (Oxgall)	Sigma-Aldrich
Kobalamin (C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ O ₁₄ P) (B12 Vitamin)	Sigma-Aldrich

Tablo 2. (devamı)

p-NP-p-D-galaktopiranosid (PNPG)	Sigma-Aldrich
Laktoz	Sigma-Aldrich
Kolesterol (C4951)	Sigma-Aldrich
o-Ftalaldehit	Sigma-Aldrich
Asetik Asit	Sigma-Aldrich
Sülfürik Asit	Sigma-Aldrich
Agaroz	Sigma-Aldrich
Blank disk	Liofilchem
Amoxicillin (AML) disk	Liofilchem
Chloramphenicol (C30) disk	Liofilchem
Sulfamethoxazole (SMX) disk	Liofilchem
Ciprofloxacin (CIP) disk	Liofilchem
Kanamycin (K) disk	Liofilchem
Ofloxacin (OFX) disk	Liofilchem
Ampicillin (AMP) disk	Liofilchem
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich
Lizozim	Sigma-Aldrich
TAE Buffer	Sigma-Aldrich
Klasiyum Klorür (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich
5-Bhromo-4-Choloro-3-Indolylβ-D-Galactopyranoside (Xgal)	Sigma-Aldrich
Isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG)	Sigma-Aldrich
Amfisilin	Sigma-Aldrich
MRS Agar	Sigma-Aldrich
MRS Broth	Sigma-Aldrich
M17 Agar	Sigma-Aldrich

Tablo 2. (devamı)

M17 Broth	Sigma-Aldrich
Nutrient Agar	Sigma-Aldrich
Nutrient Broth	Sigma-Aldrich
LB Agar	Sigma-Aldrich
LB Broth	Sigma-Aldrich
TSA (Tryptic Soy Agar)	Sigma-Aldrich
TSB (Tryptic Soy Broth)	Sigma-Aldrich
Blood Agar	Sigma-Aldrich
PDA (Potato Dextrose Agar)	Sigma-Aldrich
PDB (Potato Dextrose Broth)	Sigma-Aldrich
API 50 CHL Kit	BioMérieux
API 20 E Kit	BioMérieux
API ZYM Kit	BioMérieux
Wizard R Genomic DNA Purification Kit	Promega
Wizard R Plus SV Minipreps DNA Purification Systems	Promega
pGEM- T- Easy Vector System	Promega

Kullanılan Materyaller ve Cihazlar

Tablo 3. Tez Dahilinde Kullanılan Materyal ve Cihazlar

MATERYAL VE CİHAZ	FİRMA
İnkübatör	Thermo
Çalkalamalı inkübatör	Zhicheng - ZHWY2102C
Santrifüj	Hettich Mikro 220 R
Çalkalamalı Su Banyosu	Memmert WNB14
Mikroskopik Görüntüleme Sistemi	Lecia – Samsung
Otoklav	Hirayama
Saf Su Cihazı	mpMiniPure DestUp
UV-Spektrofotometre	Beckman Coulter DU-730
Nanodrop	Thermo – MultiscanGo
PCR Cihazı	Senso Quest-Labcyler
Jel Görüntüleme Sistemi	VILBER LOURMAT-Quantum
pH Metre	Mettler Toledo - SevenCompact
Hassas Terazı	Shimadzu – ATX 224
Kar Makinası	Scotsman – AF80
Mikropipet Takımı	Eppendorf
Steril kabin	Telstar Bio-II-A
Vorteks	Wisemix VM-10
Çoklu Blok Isıtıcısı	Lab-Line
Buzdolabı (+4°C)	Uğur
Çeker Ocak	Tolkim
Derin Dondurucu (-20°C)	Vestel FT 280, Siemens
Derin Dondurucu (-86°C)	New Brunswick Premium U410
15 mL ve 50 mL’lik Santrifüj Tüpleri	Labsolute/ Isolab
PCR Tüpleri	Labsolute/Isolab

Tablo 3. (devamı)

Pipet Uçları	Isolab
1,5 ve 3 mL’lik Kuvarz Küvetler	Merck
1,5-2 mL’lik Tüpler ve Raklar	Eppendorf
Türbidimetre (EPA) Cihazı	Hach Türkiye

Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı**Tablo 4.** Tez Dahilinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

ÇÖZELTİ ADI	İÇERİK
%0,9’luk NaCl Çözeltisi	0,9 gr NaCl tartılıp, 100 ml saf suda çözüldü.
Lügol Solüsyonu	1 gr iyot ve 2 gr KCl tartılıp, son hacim saf su ile 100 ml’ye tamamlandı.
Safranin Solüsyonu	1 gr safranin %96’lık EtOH’da çözülüp, üzerine 100 ml saf su eklendi.
Kristal Violet Solüsyonu	2 gr kristal violet %96’lık EtOH’da çözülüp, üzerine 80 ml saf su eklendi.
KOH Solüsyonu	3 gr KOH tartılıp, 100 ml saf suda çözüldü ve otoklavlandı.
50 mM EDTA Solüsyonu	1,46 g EDTA tartılıp 100 mL suda çözdürüldü ve pH’sı 8’e tamamlandı.
%70’lik EtOH	70 mL EtOH, 30 mL distile su ile 100 mL’ye tamamlandı.
1X TAE Tamponu	100 ml 10X TAE’den alınıp, hacmi 1000 ml ye tamamlandı.
CaCl ₂ Solüsyonu	100 mM olacak şekilde saf su ile hazırlandı ve ağzı pamukla kapatılarak otoklavlandı.

Tablo 4. (devamı)

Amfisilin Solüsyonu	20 mg/ml olacak şekilde steril saf su ile hazırlandı.
X- Gal Solüsyonu	40 mg/ml olacak şekilde dimetil formamid ile hazırlandı.
IPTG Solüsyonu	23,8 mg/ml olacak şekilde steril saf su ile hazırlandı.

Bakteri İzolasyonu

Örneklerin toplanması

Tez kapsamında yapılan bakteri izolasyonu için kaynak olarak Türkiye'nin farklı yörelerinden (Gaziantep, Kayseri, Erzurum, Maraş, Konya, Karaman, Van) toplanan sucuk ve peynir örnekleri kullanıldı. Temin edilen numuneler aseptik koşullar altında laboratuvar ortamına getirildi ve izolasyon çalışmalarına başlandı.

Laktik Asit Bakterilerinin izolasyonu

Çeşitli bölgelerden getirilen sucuk ve peynir örneklerinden laktik asit bakterilerinin izole edilmesi için, öncelikle her bir örnekten 25 g deney numunesi tartıldı. Örnekler özel poşetlere alınarak, üzerlerine 225 mL % 0,9'luk steril fizyolojik su (NaCl) eklendi. Daha sonra bu özel poşetler içerisindeki örnekler Stomacher' e konuldu ve burada homojenize edildi. Ardından steril serum fizyolojik su kullanılarak, uygun dilüsyonlar (10^{-1} 'den 10^{-7} 'ye) hazırlandı. Hazırlanmış olan homojenat, dilüsyon tüplerine aktararak, bir seri dilüsyon elde edildi. Her bir dilüsyon tüpünden 100 µL örnek alındı ve hem MRS hem de M17 agar içeren petrilere yayma ekim yapıldı. Ekim yapılan petriler 37°C'de 48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Süre sonrasında oluşan kolonilerden koloni morfolojisi farklı olanlar seçildi ve hem MRS hem de M17 agara 3 faz çizgi ekim yapıldı. Daha sonra petriler 37°C'de 48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Oluşan saf koloniler, uzun süreli muhafaza için gliserol içeren stok besiyerine aktarıldı ve -86 °C' de kullanılıncaya kadar stoklandı (Castilho *et al.* 2019; Adıgüzel, 2008).

Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Fenotipik Karakterizasyonu

İzolasyon aşamasında elde edilen izolatların laktik asit bakterisi (LAB) olup olmadığını anlamak amacıyla çeşitli konvensiyonel testlere tabi tutuldu. Bu amaçla öncelikle tüm izolatların petri görüntüleri incelendi ve tipik görünümlü koloniler, laktik asit bakterisi

olabileceği düşünülerek seçildi. Bu kapsamda seçilen izolatların daha sonra Gram özelliklerine, endospor varlığına, oksidaz ve katalaz enzimi varlığına, glikozdan gaz üretim potansiyellerine bakılarak, laktik asit bakterisi olabilme ihtimalleri değerlendirildi.

Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Hemolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi

Fenotipik olarak karakterize edilen izolatlardan tipik görünümlü ve ayırt edici fenotipik karaktere sahip olan bakteri izolatları seçilerek ilk aşamada hemolitik aktiviteleri değerlendirildi. Seçilen izolatlar başlangıçta MRS besiyeri ortamında 24-48 saat süre ile 37°C’de aktive edildi. Ardından %5 (v/v) koyun kanı içeren Columbia agar plakalarına, yayma ekim yöntemiyle aktarıldı. Plakalar daha sonra 37 °C’de 24-48 saat süreyle inkübe edildi. Hemolitik reaksiyonlar, üç farklı reaksiyon ile karakterize edilir: Kolonilerin çevresinde açık bir hidroliz bölgesinin varlığı β -hemoliz; kolonilerin etrafında yeşil renkli kısmi bir hidroliz bölgesinin varlığı α -hemoliz; kolonilerin etrafında herhangi bir hidroliz bölgesinin olmaması ise γ -hemoliz olarak değerlendirilir. Hemolitik aktivitelerinin belirlenmesi kapsamında yapılan bu yöntemde; γ -hemolizli suşlar güvenli suş olarak kabul edildi (Motey *et al.* 2021).

Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Düşük pH’ ya Dirençlerinin Belirlenmesi

İzolatların düşük pH değerlerinde gelişim gösterip gösteremediklerini belirlemek amacıyla; öncelikle farklı pH değerlerine (pH: 1, pH: 2, pH: 3) sahip MRS ve M17 Broth besiyerleri hazırlandı. Ardından test izolatları, MRS ve M17 Broth besiyerlerine inoküle edildi ve 24-48 saat süreyle 37°C’de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra spektrofotometrede (OD600) ölçüm yapılarak, izolatların belirlenen pH değerlerinde gelişim gösterip gösteremedikleri tespit edildi (Mantzourani *et al* 2019).

Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Gastrointestinal Koşullara Direnç Yeteneklerinin Belirlenmesi

Pepsin direnci

İzolatların pepsine olan dirençlerinin araştırılması için öncelikle izolatlar, MRS ve M17 Broth besiyerlerinde aktive edildi. 37°C’deki 24-48 saatlik inkübasyonun ardından kültürler 10.000xg’de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüjün ardından büyüyen bakteri hücreleri toplandı. Hücreler iki kez PBS ile yıkandı. Ardından yıkanan hücreler FTS (% 0,85 NaCl, 3 mg/mL pepsin, pH 2) çözeltisi içinde yeniden süspanse edildi. Süspansiyon 37°C’de 4 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından bir seri dilüsyon (10^{-1} ’den 10^{-4} ’e kadar) hazırlandı. Daha sonra her bir dilüsyondan 100’er μ l alınarak, MRS ve M17 agar petrilere yayma ekim yöntemiyle yayıldı. Petriler 37°C’de 24-48 saat süreyle inkübe edildi ve inkübasyonun ardından

koloni sayım işlemi gerçekleştirildi (Raveschot *et al.* 2020). Pepsine direnç gösteren izolatların canlılık düzeyleri aşağıdaki formüle göre yüzde (%) olarak hesaplandı:

$$\text{Canlılık düzeyi (\%)} = [\text{Değiştirilmiş koşullarda hayatta kalan hücre sayısı (log kob/mL)} / \text{Başlangıçta inoküle edilen hücre sayısı (log kob/mL)}] \times 100$$

Pankreatin direnci

İzolatların pankreatine olan dirençlerinin araştırılması için öncelikle izolatlar, MRS ve M17 Broth besiyerlerinde aktive edildi. 37°C'deki 24-48 saatlik inkübasyonun ardından kültürler 10.000xg'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüjün ardından büyüyen bakteri hücreleri toplandı. Hücreler iki kez PBS ile yıkandı. Ardından yıkanan hücreler FTS (% 0,85 NaCl, % 0,3 safra tuzu, 1 mg/mL pankreatin, pH 8) çözeltisi içinde yeniden süspanse edildi. Süspanسیون 37°C'de 6 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından bir seri dilüsyon (10⁻¹'den 10⁻⁴'e kadar) hazırlandı. Her bir dilüsyondan daha sonra 100'er µl alınarak, MRS ve M17 agar petrilere yayma ekim yöntemiyle yayıldı. Petriler 37°C'de 24-48 saat süreyle inkübe edildi ve inkübasyonun ardından koloni sayım işlemi gerçekleştirildi (Raveschot *et al.* 2020). Pankreatine direnç gösteren izolatların canlılık düzeyleri aşağıdaki formüle göre yüzde(%) olarak hesaplandı:

$$\text{Canlılık düzeyi (\%)} = [\text{Değiştirilmiş koşullarda hayatta kalan hücre sayısı (log kob/mL)} / \text{Başlangıçta inoküle edilen hücre sayısı (log kob/mL)}] \times 100$$

Safra direnci

İzolatların safra tuzuna olan toleranslarını araştırmak için, öncelikle tüm izolatlar başlangıçta MRS ve M17 Broth besiyerlerinde aktive edildi. 37°C'de ki 24-48 saatlik inkübasyonun ardından, kültürler 10.000xg' de 5 dakika süreyle santrifüj edildi ve Santrifüjün ardından büyüyen bakteri hücreleri toplandı. İki kez PBS ile yıkandı. % 0 ve % 0,3 konsantrasyonlarda olacak şekilde safra tuzu (oxgall) içeren MRS Broth besiyerleri hazırlandı. Toplanan hücreler bu ortamlarda süspanse edildi. Kültürler anaerobik koşullarda 37°C'de 3 saat süreyle inkübe edildi. % 0 konsantrasyonda safra tuzu içeren tüp kontrol olarak kullanıldı. İnkübasyonun ardından bir seri dilüsyon (10⁻¹ den 10⁻⁴ e kadar) hazırlandı. Her bir dilüsyondan daha sonra 100'er µl alınarak, MRS ve M17 agar petrilere yayıldı. Petriler 37°C'de 24-48 saat süreyle inkübe edildi ve inkübasyonun ardından koloni sayım işlemi gerçekleştirildi (Raveschot *et al.* 2020). Safra tuzuna direnç gösteren izolatların canlılık düzeyleri aşağıdaki formüle göre yüzde (%) olarak hesaplandı:

$$\text{Canlılık düzeyi (\%)} = [\text{Değiştirilmiş koşullarda hayatta kalan hücre sayısı (log kob/mL)} / \text{Başlangıçta inoküle edilen hücre sayısı (log kob/mL)}] \times 100$$

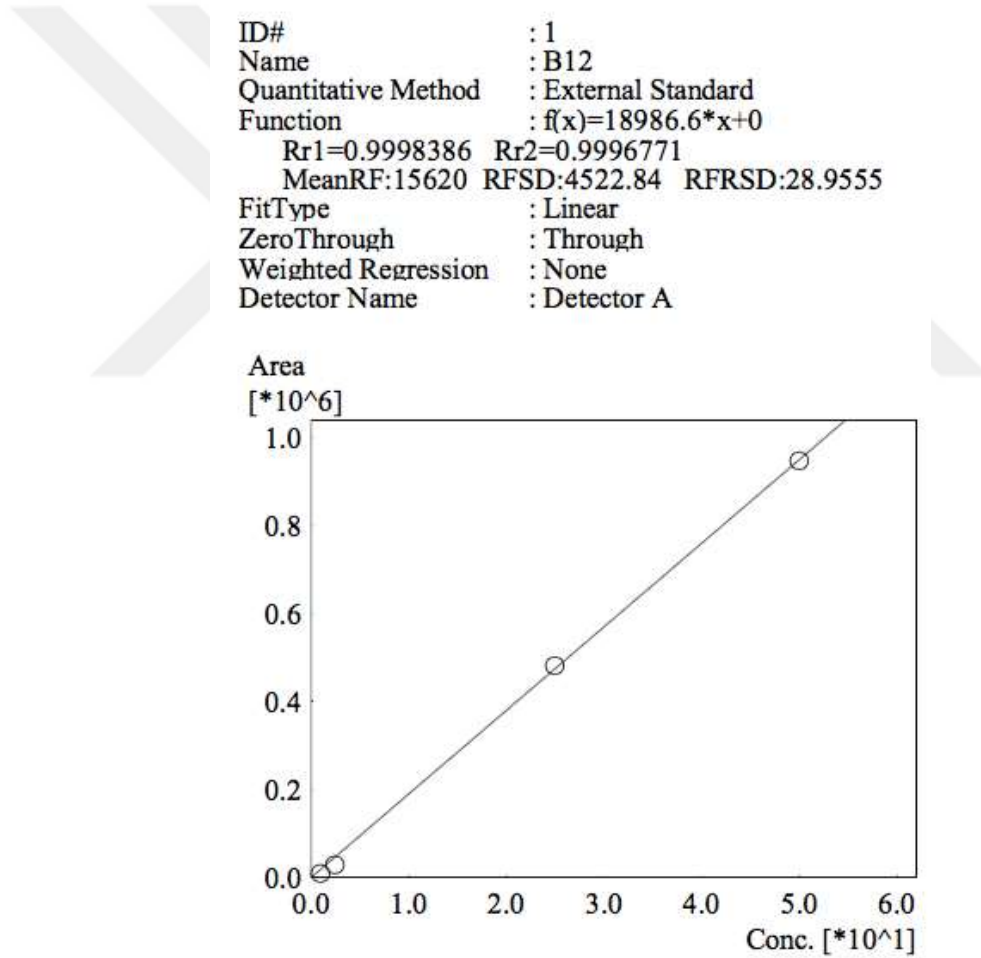
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının B12 Vitamini Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi

HPLC ile B12 vitamini analizi için numunenin hazırlanması

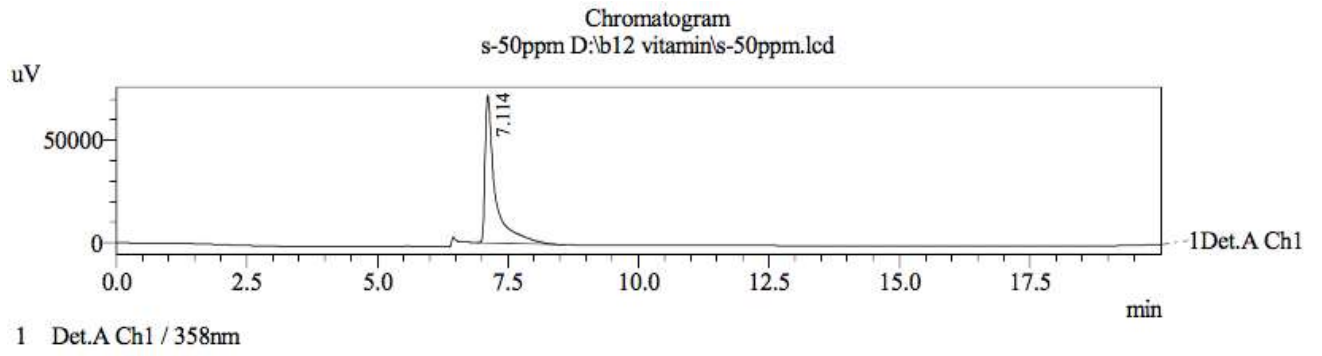
HPLC’de B12 vitamini analizi için gelen numuneler, analizden önce 0,45 µm PTFE (ISOLAB marka) membran filtreden geçirilerek viallere enjekte edildi.

HPLC ile B12 vitamini analizinde standart çözeltilerin hazırlanması

HPLC’de B12 vitamini analiz metodu oluşturmak için $\geq$ % 98 saflıkta B12 ($C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$, SIGMA) vitamin standardı kullanıldı. Standart çözeltileri; 1 ppm, 2.5 ppm, 25 ppm ve 50 ppm’lik konsantrasyonlarda ultra saf su ile hazırlandı. Standart çözeltiler için kalibrasyon eğrisi çizildi (Şekil 8: B12 vitamini için kalibrasyon eğrisi). 50 ppm B12 standardına ait kromatogram görüntüsü Şekil 9’da verildi.



Şekil 8. B12 vitamini için kalibrasyon eğrisi.



Şekil 9. 50 ppm B12 vitamin standart kromatogramı.

HPLC ile B12 vitamini analizi metot oluşturulması

Çalışmada numunelerin analizi için Shimadzu marka (Kyoto, Japan) DGU-20A5 Prominence Degazer ünitesi, SIL-20A HT Prominence Auto Sampler, CTO-10 AS VP kolon fırını ve SPD-20A Prominence UV/VIS Dedektör kullanıldı. Ayrım; 5 µm, 4.6x250 mm C18 (Teknokroma marka) kolonunda gerçekleştirildi. Analiz gradiyent metot oluşturularak gerçekleştirildi ve şartlar aşağıdaki gibi uygulandı:

Mobil faz, A: % 0,025 asetik asit, B: saf asetonitril (ACN), gradient akış (Mobil faz B için, 0.5. dk: %0, 0.7.dk: %15, 7.dk: %70, 12. dk: %70, 18. dk: %0), dalga boyu 358 nm, 0.2 AUFS oran, enjeksiyon hacmi 20 µL, kolon fırın sıcaklığı 25 °C, akış 0,8 mL/dk, maksimum basınç 20 MPa, minimum basınç 10 MPa, metot süresi 20 dk ve Retention Time 7.1-7.2 dk olarak belirlendi.

Analizlerde ayarlama, veri toplama ve veri analizi dahil olmak üzere cihazı kontrol etmek için LCSolution Version 1.22 software cihaz yazılımı kullanıldı. Numunelerdeki B12 vitamini analiz sonuçları gerekli hesaplamalar yapılarak, ppm olarak verildi.

Laktik Asit Bakteri İzolatlarının β-Galaktosidaz (Laktaz) Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

İzolatların β-galaktosidaz (laktaz) enzim aktivitesini belirlemek amacıyla iki farklı yöntem kullanıldı. 1. yöntemde öncelikle; β-galaktosidaz (laktaz) salınımını artırmak için, %1 (v/v) konsantrasyonda laktoz içeren MRS ve M17 Broth besiyerlerinde izolatlar aktive edildi. 37°C’de 24-48 saat inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyonun ardından kültürler santrifüjlendi ve elde edilen süpernatantlar alınarak, β-galaktosidaz enzim aktivitesi için kullanıldı. Aktivite ölçümü için; 25 µl %0,1 p-NP-p-D-galaktopiranosid (PNPG), 75 µl 50 mM fosfat tamponu (pH 7) ve 25 µl süpernatanttan oluşan bir süspansiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon karışımı 37°C’de 60 dakika inkübe edildikten sonra, 405 nm’de absorbans ölçümü gerçekleştirildi (Benítez-Cabello *et al.* 2020).

İzolatların β -galaktosidaz (laktaz) enzim aktivitesini belirlemek amacıyla yapılan 2. yöntemde API ZYM test kitinden yararlanılarak, izolatların çeşitli enzim profilleri ortaya konuldu. Bu amaçla öncelikle izolatlar MRS ve M17 broth besiyerlerine inoküle edilerek 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra kültürler, 15000 g'de 10 dk santrifüj edilerek, sıvı kısım uzaklaştırıldı ve dipte kalan hücreler toplandı. Elde edilen hücreler, 1mL kit (Biomerieux – France) içerisindeki steril API NaCl (% 0,85) solusyonu ile süspanse edildi ve bulanıklık McFarland 5-6 değerine ayarlandı. McFarland ayarı yapılan süspansiyon, API ZYM test kitinde bulunan kuyucukların içerisine 65 μ L olacak şekilde ilave edildi. Test kitleri 37°C'de 24-48 saat süreyle inkübe edildi. Süre sonunda kuyucukların içerisine sırasıyla; 1 damla ZYM A ve ZYM B reaktifi damlatılarak, 5 dk bekletildi. Sonrasında 10 sn 1000 W ışık kaynağı altında tutulan striplerdeki renk değişimleri ve yoğunlukları, kullanma kılavuzunda belirtilen şekilde değerlendirildi (bioMérieux).

Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Kolesterolü Düşürme Potansiyellerinin Belirlenmesi

İzolatların kolesterolü düşürme yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan 1.yöntemde klasik PCR işlemi gerçekleştirildi. Kolesterol oksidaz genine ait primerlerle;

(CHO Forward: 5'-ATACTGCAGATGACCGATAGCCGGGCGAACA-3';

CHO Reverse: 5'-ATAAAGCTTTCCTGATGTCGGACGAGATG-3')

spesifik PCR yapıldı. PCR sonucunda kolesterol oksidaz genine ait bant görülmesi, izolatların kolesterolü düşürme yeteneklerinin olduğuna işaret etti. Spesifik PCR için ; 15 μ l ddH₂O, 2.5 μ l PCR tamponu 1,8 μ l 1.5 mM MgCl₂, 0.7 μ l 0.4 mM dNTP, 1 μ l Taq DNA polimeraz, 3 μ l 0,5 pmol ileri ve geri primer, 3 μ l kalıp DNA içeren, 30 μ l den oluşan bir PCR karışımı hazırlandı. PCR işleminin gerçekleştirilmesi için uygun koşulları içeren PCR reaksiyonu hazırlandı. Elde edilen PCR ürünlerinin 4 μ l si (yaklaşık 1600 bp), % 0,8 agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi (Lashkarian *et al.* 2010). PCR reaksiyonu için Tablo 5 deki PCR protokolü takip edildi.

Tablo 5. CHO (Kolesterol oksidaz) PCR Protokolü

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön Denatürasyon	95	5 dk	1
Denatürasyon	94	45 s	30
Primer Bağlanma Basamağı	58	45 s	
Primer Uzama Basamağı	72	90 s	

İzolatların kolesterolü düşürme yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan 2.yöntemde ise; izolatlar öncelikle, MRS ve M17 Broth besiyerlerinde aktive edildi. 37°C'deki 24-48 saatlik inkübasyonun ardından her bir izolat; 100 µg/mL olacak şekilde suda çözünür kolesterol (C4951, Sigma-Aldrich) içeren MRS ve M17 broth besiyerleri içerisine inoküle edildi. Kültürler 37°C'de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Kontrol olarak, kolesterol içermeyen MRS ve M17 Broth kullanıldı. Inkübasyonun ardından, kültürler ve kontrol tüpü 10000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi. Süpernatantlar kolesterol seviyesinin ölçümü için kullanıldı. 0,5 mL süpernatant, 2 mL KOH ve 3 mL saf etanolden oluşan bir karışım hazırlanarak 1 dakika vortekslendi, 60°C'de 15 dakika ısıtma ve ardından 25°C'ye kadar soğutma işlemi gerçekleştirildi. 3 mL saf su ve 5 mL hekzan ilave edildikten sonra, karışım 1 dakika daha vortekslendi. Karışım 25°C'de 15 dakika tutulduktan sonra, sıcaklık 60°C'ye yükseltilerek 2,5 mL' lik heksan tabakası buharlaştırılarak uzaklaştırıldı. Elde edilen tortu, 4 mL O-ftalaldehit reaktifinde (0,5 mg/mL asetik asit içinde) çözündürüldü ve karışım oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Inkübasyonun ardından karışıma 2 mL konsantre sülfürik asit ilave edildi. Karışım 1 dakika vortekslendi ve 25°C'de 10 dakika bırakıldı. Son olarak, karışımların absorbanları bir Beckman Coulter DU730 spektrofotometre kullanılarak, 550 nm'de ölçüldü. Kontrol ortamının kolesterol içeriği ile kültür maddelerinin kolesterol içeriği karşılaştırıldığında gözlemlenen farklar, azalan kolesterol miktarı olarak kabul edildi. Kolesterol düzeylerindeki düşüşler yüzde olarak verildi (Albano *et al.* 2018; Domingos-Lopes *et al.* 2020).

Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Linoleik Asit Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi

İzolatların linoleik asit üretimi gen seviyesinde test edildi. Bu amaçla linoleik asit üretiminden sorumlu LA1 geninden yararlanıldı. Bu genin temel görevi LA (Linoleik asit)'yı CLA (Konjüge linoleik asit)'ya dönüştürmektir. LA1 geninin analizi için bu gene ait primerlerle;

(LISO3:5'-CGGACNTACGTGAYTTAATGG-3'

LISO4: 5'-TGGTGMACMACRATCGACAT-3')

spesifik PCR işlemi gerçekleştirildi. Spesifik PCR için ; 15 µl ddH₂O, 2.5 µl PCR tamponu 1,8 µl 1,5 mM MgCl₂, 0.7 µl 0,4 mM dNTP, 1 µl Taq DNA polimeraz, 3 µl 0,5 pmol ileri ve geri primer, 3 µl kalıp DNA içeren, 30 µl den oluşan bir PCR karışımı hazırlandı. PCR işleminin gerçekleştirilmesi için uygun koşulları içeren PCR reaksiyonu hazırlandı. Elde edilen PCR

ürünlerinin 4 µl si, % 0,8 agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi (Ribeiroa *et al.* 2018). PCR reaksiyonu için Tablo 6 daki PCR protokolü takip edildi.

Tablo 6. LA1 (Linoleik asit) PCR Protokolü

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön Denatürasyon	95	5 dk	1
Denatürasyon	94	30 s	35
Primer Bağlanma Basamağı	56	45 s	
Primer Uzama Basamağı	72	1 dk	

Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

İzolatların antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla disk difüzyon yöntemi kullanıldı. Bu amaçla altı farklı gıda patojeni bakteri [*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Gram +), *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (Gram +), *Bacillus cereus* ATCC 11778 (Gram +), *Salmonella typhi* ATCC 13076 (Gram -), *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram -), *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715 (Gram -)], iki farklı gıda patojeni fungus (*Candida albicans* ATCC 14053 , *C. glabrata* ATCC 2001) ve bir adet gıda patojeni küf (*Aspergillus niger* ATCC16888) tercih edildi. Öncelikle kullanılacak olan mikroorganizmalar uygun koşul ve besi ortamında aktive edildi. Uygun sıcaklıkta bir gece inkübe edilen kültürlerin daha sonra OD600 nm’de ölçümleri yapıldı. İstenilen büyüme konsantrasyonu elde edilen organizmanın son OD değerinin 0,4 olacak şekilde, fizyolojik suyla süspanse hale getirilmesi sağlandı. Elde edilen solüsyondan 100 µL alındı ve uygun petri ortamına yayma ekim yöntemiyle yayıldı. Bu işlemin ardından mikroorganizmanın yayıldığı petri ortamına boş diskler yerleştirildi. Pozitif kontrol amacıyla kloromfenikol antibiyotiği, negatif kontrol amacıyla da TSB (Tryptic Say Broth) kullanıldı. Bu sırada ayrıca test edilecek olan LAB kültür örnekleri de saf su ile süspanse edilip hazırlandı, hazırlanan örneklerden 20-25 µL alınarak, boş disklere aktarıldı. Daha sonra negatif kontrol olan TSB’den de yine aynı miktarda alınarak disk üzerine konuldu ve inkübe edildi. İnkübasyon 1 gün gerçekleştirildi ve sonuçlar inkübasyonun ardından değerlendirildi (Kıvanç, 2018; Ruggirello *et al.*2019).

Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Virülans Genlerinin Spesifik PCR ile Belirlenmesi

İzolatların virülans belirleyicileri olan; *asa1*, *cylA*, *esp*, *gele* ve *hyl* genlerini taşıyıp taşımadıkları spesifik PCR ile belirlendi. *asa1*, *cylA*, *esp*, *gele* ve *hyl* genlerinin analizi için bu gene ait primerlerle;

(asa1F: 5'-GCACGCTATTACGAACTATGA-3'

asa1R: 5'-TAAGAAAGAACATCACCACGA-3'

gele F: 5'-TATGACAATGCTTTTTGGGAT-3'

gele R: 5'-AGATGCACCCGAAATAATATA-3'

cylA F: 5'-ACTCGGGGATTGATAGGC-3'

cylA R: 5'-GCTGCTAAAGCTGCGCTT-3'

esp F: 5'-AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG-3'

esp R: 5'-AATTGATTCTTTAGCATCTGG-3'

hyl F: 5'-ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG-3'

hyl R: 5'-GACTGACGTCCAAGTTTCCAA-3')

spesifik PCR işlemi gerçekleştirildi. Spesifik PCR için ; 15 µl ddH₂O, 2.5 µl PCR tamponu 1,8 µl 1,5 mM MgCl₂, 0.7 µl 0,4 mM dNTP, 1 µl Taq DNA polimeraz, 3 µl 0,5 pmol ileri ve geri primer, 3 µl kalıp DNA içeren, 30 µl den oluşan bir PCR karışımı hazırlandı. PCR işleminin gerçekleşebilmesi için uygun koşulları içeren PCR reaksiyonu hazırlandı. Elde edilen PCR ürünlerinin 4 µl si, % 0,8 agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi (Tatsing Foka and Ateba 2019). PCR reaksiyonu için Tablo 7 deki PCR protokolü takip edildi.

Tablo 7. Virülans Genlere Ait PCR Protokolü

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön Denatürasyon	95	3 dk	1
Denatürasyon	94	30 s	30
Primer Bağlanma Basamağı	56	30 s	
Primer Uzama Basamağı	72	60 s	

Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Moleküler İdentifikasyonu

Tez kapsamında bu aşamaya kadar yürütülen çalışmalar sonucunda istenilen durumu sağlayan izolatlar son olarak moleküler olarak identifiye edildi. Bu amaçla 16S rRNA dizi analizi yöntemi kullanıldı.

16S rRNA Gen Bölgesinin Klonlanması

Genomik DNA izolasyonu

İzolasyon için; MRS ve M17 agar besiyerlerine çizgi ekim yöntemiyle ekilerek aktifleştirilen kültürler kullanıldı. İzolasyon aşamasında Promega WizardR Genomic DNA Purification Kit (A2360) protokolü uygulandı.

DNA konsantrasyonlarının ölçülmesi ve çalışma solüsyonlarının hazırlanması

DNA miktarı, direkt olarak 260 nm'deki absorbans ölçümüyle belirlenirken, genetik materyalin protein kirliliği taşıyıp taşımadığı ise 280 nm'de okunan absorbans değeriyle tespit edildi. A260/A280 oranı 1-1,7 arasında olan örnekler çalışma solüsyonu hazırlamak için kullanıldı (Adıgüzel 2006).

DNA örneğinin ve çalışma solüsyonunun konsantrasyonunun belirlenmesi (µg/ml)

DNA Konsantrasyonu (µg/ml)=A260xSeyreltme Faktörü (500)x50 (DNA için sabit değer) formülü kullanılarak, stok solüsyonun DNA konsantrasyonu belirlendi (Adıgüzel 2006).

16S rRNA PCR İşlemi

İzolatların 16S rRNA gen bölgeleri evrensel primerler kullanılarak, *in vitro* koşullar altında spesifik PCR ile çoğaltıldı. Bu amaçla, her bir örnek için, 30 µl'lik reaksiyon hazırlandı. Reaksiyon tüpüne; 14,1 µl ddH₂O, 3 µl 10X PCR tamponu, 1,8 µl MgCl₂, 1,2 µl DMSO, 0,6 µl dNTP, 3 µl (5 µM) evrensel primer 27F (forward 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3'), 3 µl (5µM) primer 1492R (reverse 5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3'), 0,3 µl Taq DNA polimeraz ve 3 µl kalıp DNA ilave edildi. PCR işleminin gerçekleşebilmesi için uygun koşulları içeren PCR reaksiyonu hazırlandı. Elde edilen PCR ürünlerinin 4 µl si, % 0,8 agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi (Adıgüzel 2006). PCR reaksiyonu için Tablo 8 deki PCR protokolü takip edildi.

Tablo 8. 16S rRNA PCR Protokolü

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön Denatürasyon	94	2 dk	1
Denatürasyon	94	1 dk	36
Primer Bağlanma Basamağı	52	1 dk	
Primer Uzama Basamağı	72	2 dk	

Kompetent Hücrenin Hazırlanması

İzolatlara ait 16S rRNA gen bölgeleri PCR ile amplifiye edildikten sonra sekans dizilerinin eldesi için, klonlama işlemi gerçekleştirildi. Bu amaçla, klonlamanın ilk basamağı olan kompetent hücre hazırlama aşamasına geçildi. Bunun için, *Escherichia coli* JM101 suşu kullanıldı (Adıgüzel 2006; Adıgüzel 2008).

Ligasyon İşlemi

PCR ile amplifiye edilen 16S rRNA gen bölgeleri pGEM®-T Easy (Promega) vektörüne aktarıldı. Bu amaçla hazırlanan reaksiyon için kullanılan bileşenler aşağıda verilmiştir:

- 5 µl, 2X Ligasyon buffer
- 3 µl, PCR ürünü
- 1 µl vektör
- 1 µl T4 DNA ligaz

Yukarıdaki miktarlar 0,2 ml'lik tüplerde bir araya getirilerek, karışım hazırlandı ve 16°C'de 14 saat süre ile inkübasyona bırakıldı.

Transformasyon İşlemi

Transformasyon işlemi, ısı şok yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Isı sok yöntemi uygulamasından sonra elde edilen bakteriler, içerisinde X-gal, IPTG ve amfisilin bulunan LB agar plaklarına yayma ekim yöntemiyle yayılarak, 37°C'de 12-14 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.

Koloni Seçme ve Sıvı Kültüre Alma

İnkübasyon sonunda petrilere mavi beyaz tarama işlemi gerçekleştirildi. Beyaz koloniler genin insert olduğu pozitif koloniler olarak seçildi.

Koloni PCR İçin Hazırlık ve PCR reaksiyonu

Pozitif olduğu düşünülen beyaz renkli koloniler bir swap çubuk yardımıyla seçilerek, hazırlanan PCR reaksiyon karışımına aktarıldı. Spesifik PCR için 14,1 µl ddH₂O, 3 µl 10X PCR tamponu, 0,6 µl dNTP mix, 1,8 µl MgCl₂ (25mM), 3 µl 5 µM T7 primer, 3 µl 5µM SP6 primer, 0,3 µl Taq DNA polimeraz, 1,2 µl DMSO ve 3 µl kalıp DNA dan oluşan 30 µl' lik PCR karışımı hazırlandı.

T7: (5'-AATACGACTCACTATAG-3')

SP6: (5'- ATTTAGGTGACACTATAG-3')

PCR işleminin gerçekleştirilmesi için uygun koşulları içeren PCR reaksiyonu hazırlandı. Elde edilen PCR ürünlerinin 4 µl si, % 0,8 agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. PCR reaksiyonu için Tablo 9 daki PCR protokolü takip edildi.

Tablo 9. Koloni PCR Protokolü

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön Denatürasyon	94	10 dk	1
Denatürasyon	94	30 s	35
Primer Bağlanma Basamağı	55	30 s	
Primer Uzama Basamağı	72	2 dk	

Plazmitlerin İzolasyonu, Kontrol Edilmesi ve Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

Plazmit izolasyonu, Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, A1330) kiti ile, üretici firmanın protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Plazmitlerin konsantrasyonları, Nanodrop cihazı (Thermo Scientific, Multiskan GO, USA) kullanılarak >100 ng/µl olacak şekilde ayarlandı.

DNA Dizi Analiz Sonuçlarının İşlenmesi ve Değerlendirilmesi

Firmanın sayfasından indirilen sekans sonuçları, BioEdit programı ile analiz edilerek, FASTA formatına çevirildi. Sekans verileri anlamlı hale getirildikten sonra http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch ve <http://www.ezbiocloud.net/eztaxon/identify> veritabanları yardımıyla; izolatların tür düzeyinde identifikasyonu gerçekleştirildi.

ARAŞTIRMA BULGULARI

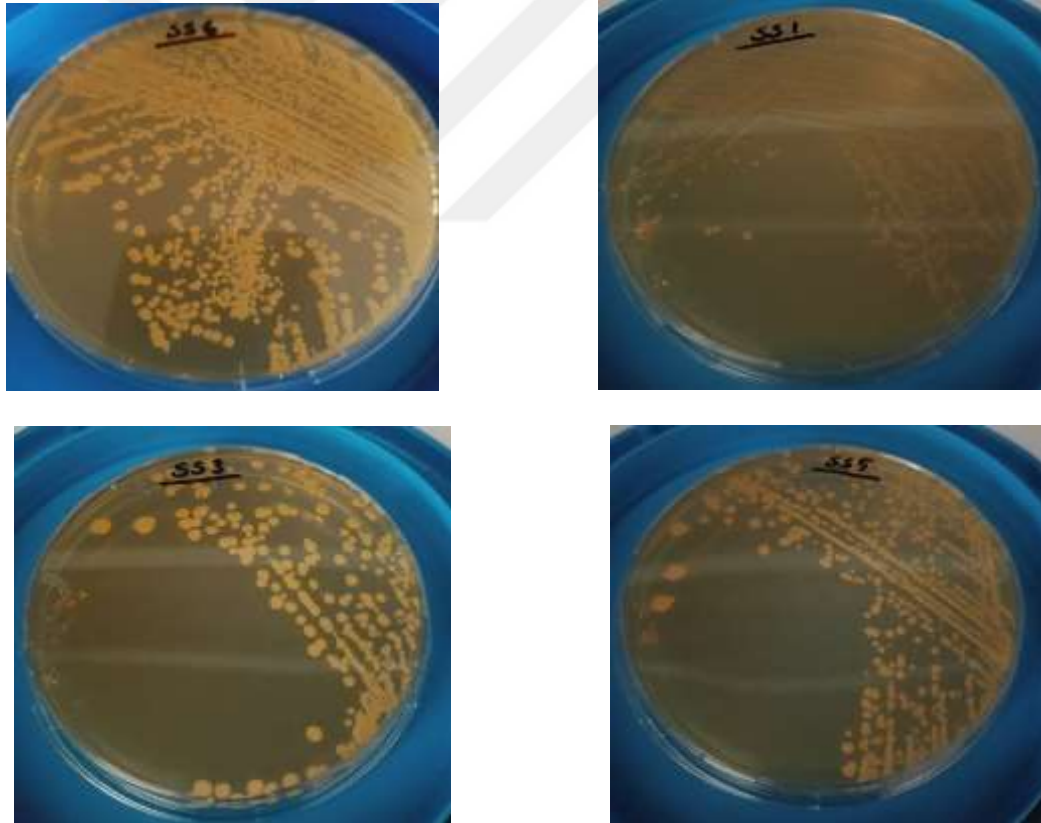
Bakteri İzolasyonu

Örneklerin toplanması

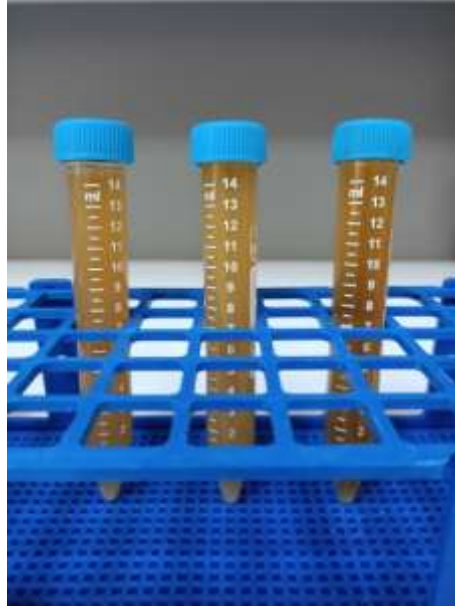
Tez çalışmasında kullanılan sucuk ve peynir örnekleri Gaziantep, Kayseri, Erzurum, Maraş, Konya, Karaman, Van illerinden temin edildi. Toplamda 7 farklı sucuk ve 5 farklı peynir örneğinden bakteri izolasyonu gerçekleştirildi.

Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Belirtilen illerden temin edilen toplam 12 adet (7 sucuk ve 5 peynir örneği) örnekten uygun prosedürler kullanılarak, bakteri izolasyonu gerçekleştirildi. Bu işlem sonucunda toplam 86 adet bakteri izolatu elde edilerek her bir suş 'SS' ile başlayan kod ile kodlandı ve kullanılıncaya kadar -86 °C'de muhafaza edildi. Elde edilen kültürlerin petri ve sıvı kültür ortamındaki görünüşleri Şekil 10 ve Şekil 11' de verilmiştir.



Şekil 10. Çeşitli izolatlara ait petri görüntüleri



Şekil 11. Çeşitli izolatlara ait sıvı kültür görüntüleri

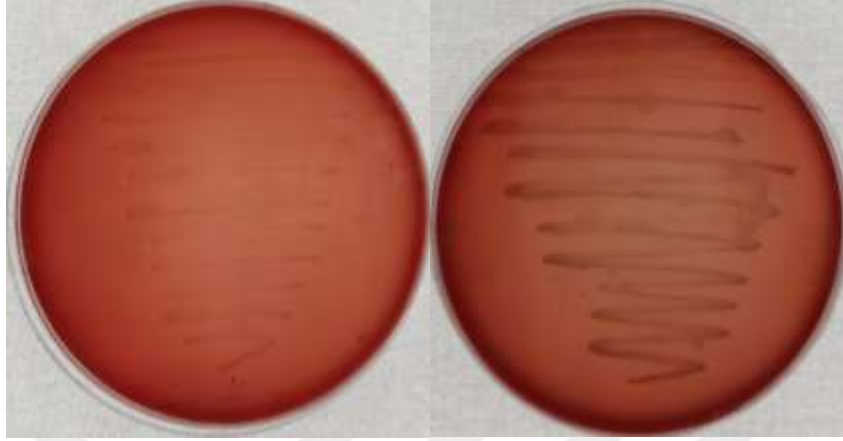
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Fenotipik Karakterizasyonu

Tez çalışması kapsamında; probiyotik potansiyelli laktik asit bakterilerinin (LAB) tespit edilebilmesi için öncelikle izole edilen bakteriler içerisinde LAB olma ihtimali yüksek olan izolatlar seçilerek toplamda 86 izolat çeşitli fenotipik testler kullanılarak karakterize edildi. Bu amaçla öncelikle koloni morfolojisine bakılarak tipik laktik asit bakterisi koloni morfolojisine sahip olan izolatlar seçildi. Daha sonra sırasıyla bu kolonilerin Gram özelliklerini belirlemek amacıyla Gram boyama, endospor varlığını belirlemek amacıyla endospor boyama, Sitokrom C proteinini barındırıp barındırmadığını anlamak amacıyla oksidaz testi, katalaz enzimine sahip olup olmadığını anlamak için katalaz testi ve fermantasyon yöntemlerini belirlemek amacıyla glikozdan gaz üretim testleri yapıldı. Yapılan testler sonucunda 86 izolattan 80 tanesinin LAB olma ihtimalinin oldukça yüksek olduğu görüldü ve deneylere bu 80 izolat üzerinden devam edildi.

Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Hemolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi

Konvensiyonel analizler sonucunda; 86 izolattan 80 tanesinin LAB ne ait özellikleri sergilediği tespit edilerek, bu kapsamda ilk aşamada test suşlarının hemolitik aktiviteleri değerlendirildi. Hemolitik aktivite sonuçları; β -hemolitik, α -hemolitik ve γ -hemolitik olarak kaydedildi. 80 izolata ait hemolitik aktivite sonuçları incelendiğinde; SS31, SS37, SS38, SS49 ve SS66 kodlu izolatların hemolitik aktiviteleri, α -hemolitik olarak; geriye kalan 75 adet izolatın ise γ -hemolitik olarak kaydedildi. 75 adet izolatın hemolitik aktivitesinin γ -hemolitik olmasından dolayı bu izolatlar, güvenli suş olarak kabul edildi. Hemolitik aktivite sonuçlarının doğruluğunun kanıtlanması ve diğer izolatlarla sonuçların karşılaştırılması amacıyla iki farklı

gıda patojeni bakteri (*Bacillus cereus* ATCC 11778 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) pozitif kontrol olarak kullanıldı ve patojenlere ait sonuçların β -hemolitik olarak kaydedildiği görüldü. Çeşitli izolatlara ait γ -hemolitik aktivite görüntüleri ve pozitif kontrol olarak kullanılan patojen bakterilere ait β -hemolitik aktivite sonuçları sırasıyla Şekil 12 ve Şekil 13 de verilmiştir.



Şekil 12. Çeşitli izolatlara ait γ -hemolitik aktivite görüntüleri



Şekil 13. Pozitif kontrol olarak seçilen *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus* a ait β -hemolitik aktivite görüntüleri

Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Düşük pH' ya Dirençlerinin Belirlenmesi

Hemolitik aktiviteleri değerlendirilen ve γ -hemolitik olduğu kanıtlanan 75 adet izolatın probiyotik olarak kullanılabilme potansiyellerinin araştırılması kapsamında ikinci aşamada bu izolatların düşük pH değerlerindeki (pH 1, pH 2 ve pH 3) canlılık oranları belirlendi. Bu amaçla; uygun besi ortamında (pH1, pH2, pH3 değerlerinde MRS Broth ve M17 Broth) büyütülen bakterilerin gelişim oranları, OD600 nm'de spektrofotometrik olarak belirlendi. Yapılan ölçümler sonucunda SS1, SS6, SS9, SS10, SS11, SS15, SS16, SS18, SS20, SS21, SS22, SS24, SS28, SS29, SS30, SS33, SS34, SS35, SS38 ve SS45 kodlu 20 izolatın pH 1, 2 ve 3 gibi çok düşük pH larda yaşayabildikleri gözlemlendi. Mide ortamına yakın olan düşük pH' lı

ortamlarda hayatta kalabilen bu 20 izolatın probiyotik potansiyelli bakteri olabileceği düşüncesiyle diğer deneysel süreçlere bu 20 izolat üzerinden devam edildi. Belirtilen 20 izolatın; pH1, pH2 ve pH3 değerlerindeki gelişimlerini gösteren OD600 nm ölçüm sonuçları Tablo 10’ da gösterilmiştir.

Tablo 10. İzolatların Düşük pH’ larda Gelişim Değerleri

İzolat Kodu	pH 1’ de gelişim (OD 600 nm)	pH 2’ de gelişim (OD 600 nm)	pH 3’ de gelişim (OD 600 nm)
SS1	0,3	0,5	0,8
SS6	0,4	0,5	0,9
SS9	0,8	1	1,2
SS10	0,3	0,6	0,5
SS11	0,5	0,5	0,6
SS15	0,4	0,5	0,8
SS16	0,3	0,6	0,7
SS18	1	1,1	1,3
SS20	0,6	0,8	0,9
SS21	0,4	0,6	0,7
SS22	0,3	0,7	0,6
SS24	0,3	0,6	0,7
SS28	0,7	0,9	1,1
SS29	0,8	0,8	1
SS30	0,9	0,9	1,2
SS33	0,7	0,8	1
SS34	0,5	0,6	0,6
SS35	0,5	0,7	0,8
SS38	1,1	1,2	1,1
SS45	0,3	0,7	0,8

Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Gastrointestinal Koşullara Direnç Yeteneklerinin Belirlenmesi

İzolatların gastrointestinal koşullara karşı direnç yetenekleri; pH 2'ye ayarlanmış pepsinli, pH 8'e ayarlanmış pankreatinli ve % 3 konsantrasyona ayarlanmış safra tuzlu ortamda canlılık düzeylerinin yüzde olarak ölçülmesiyle belirlendi. Belirtilen analizler; düşük pH'lara direnç gösteren 20 izolata (SS1, SS6, SS9, SS10, SS11, SS15, SS16, SS18, SS20, SS21, SS22, SS24, SS28, SS29, SS30, SS33, SS34, SS35, SS38 ve SS45) uygulandı. Yüzde olarak canlılık düzeyleri incelendiğinde; izolatlardan SS9, SS10, SS18, SS20, SS21, SS22, SS28, SS29, SS30, SS33 ve SS38 kodlu 11 adet izolatın özellikle pepsine; SS1, SS9, SS10, SS15, SS18, SS20, SS21, SS22, SS28, SS29, SS30, SS33 ve SS38 kodlu 13 adet izolatın pankreatine; SS9, SS18, SS20, SS28, SS29, SS30, SS33 ve SS38 kodlu 8 adet izolatın ise safra tuzuna karşı toleranslı suşlar olduğu belirlendi. İzolatların pepsin, pankreatin ve safra tuzuna karşı olan dirençleri; uygun dilüsyonda gelişim gösteren petrillerdeki kolonilerin sayılarak formülize edilmesiyle tespit edildi. Hesaplamalar yüzde (%) olarak yapıldı. Bu amaçla ;

“Canlılık düzeyi (%) = [Değiştirilmiş koşullarda hayatta kalan hücre sayısı (log CFU/mL) / Başlangıçta inoküle edilen hücre sayısı (logCFU/mL)] x 100 “

formülü kullanıldı. İzolatların pepsine karşı olan dirençlerinin yüzde olarak; 23,6 ile 100 arasında (Tablo 11), pankreatine karşı olan dirençlerinin yüzde olarak; 65,2 ile 100 arasında (Tablo 12), safra tuzuna karşı olan dirençlerinin ise yüzde olarak; 56,5 ile 95,8 arasında değişim gösterdikleri görüldü (Tablo 13). Elde edilen sonuçlara göre; izolatların pankreatine olan toleranslarının pepsine olan toleranslarından yüzde olarak daha yüksek olduğu, safra tuzuna toleransı olan izolat sayısının da pepsin ve pankreatine göre daha düşük olduğu tespit edildi. Belirtilen ortamlardaki canlılık düzeylerini belirlemek için yapılan petri denemelerinde, en iyi dilüsyon oranında gelişen kolonilerin olduğu petrilere ait görüntüler Şekil 14, 15, 16' da verilmiştir.

Tablo 11. İzolatların Pepsine Karşı Dirençleri

İzolat Kodu	Pepsin (pH 2)		
	Geçerli Sayım (log kob/mL)		Canlılık Düzeyi
	0.saat	4.saat	(%)
SS1	7,6	1,8	23,6
SS6	7,0	3,0	42,8
SS9	6,9	6,0	86,9
SS10	7,5	5,2	69,3
SS11	7,1	2,4	33,8
SS15	7,4	3,2	43,2
SS16	6,9	1,9	27,5
SS18	7,3	9,2	>100
SS20	7,4	6,7	90,5
SS21	6,9	5,0	72,4
SS22	7,1	5,3	74,6
SS24	6,9	2,0	28,9
SS28	7,2	5,1	70,8
SS29	7,0	5,0	71,4
SS30	6,9	5,0	72,4
SS33	7,3	7,2	98,6
SS34	7,0	2,7	38,5

Tablo 11. (devamı)

SS35	7,0	1,8	25,7
SS38	7,6	8,1	>100
SS45	7,2	3,1	29,1

Tablo 12. İzolatların Pankreatine Karşı Dirençleri

İzolat Kodu	Pankreatin (pH 8)		
	Geçerli Sayım (log kob/mL)		Canlılık Düzeyi
	0.saat	6.saat	(%)
SS1	7,6	7,0	92,1
SS6	7,0	5,2	72,2
SS9	6,9	8,1	>100
SS10	7,5	7,1	94,6
SS11	7,1	5,4	76
SS15	7,4	7,0	94,5
SS16	6,9	5,1	73,9
SS18	7,3	8,0	>100
SS20	7,4	8,3	>100
SS21	6,9	7,0	>100
SS22	7,1	6,9	97,1
SS24	6,9	4,8	69,5
SS28	7,2	7,1	98,6

Tablo 12. (devamı)

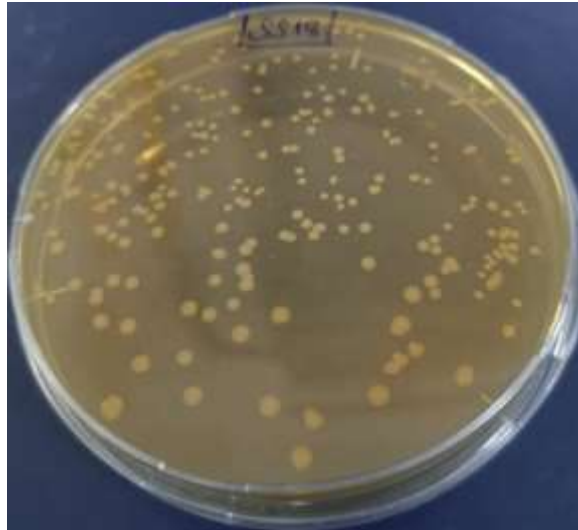
SS29	7,0	6,9	98,5
SS30	6,9	8,6	>100
SS33	7,3	8,0	>100
SS34	7,0	5,1	71,4
SS35	7,0	4,8	68,5
SS38	7,6	8,2	>100
SS45	7,2	4,7	65,2

Tablo 13. İzolatların Safra Tuzlarına Karşı Dirençleri

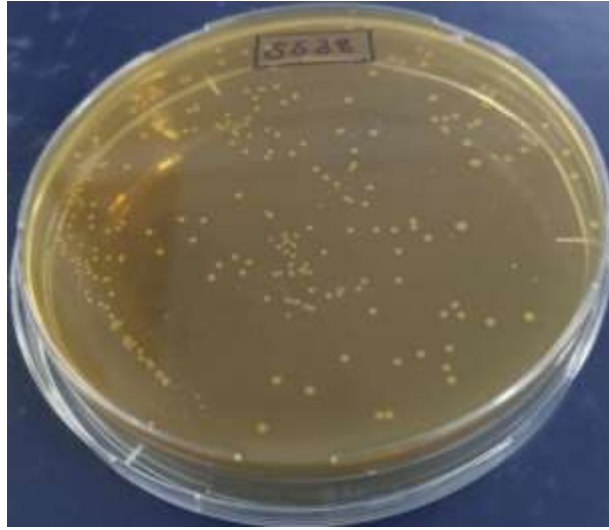
İzolat Kodu	% 0 Safra		% 3 Safra	
	Geçerli Sayım (log kob/mL)	Canlılık Düzeyi (%)	Geçerli Sayım (log kob/mL)	Canlılık Düzeyi (%)
SS1	7,6	100	4,3	56,5
SS6	7,0	100	4,7	67,1
SS9	6,9	100	6,2	89,8
SS10	7,5	100	5,1	68
SS11	7,1	100	4,8	67,6
SS15	7,4	100	4,2	56,7
SS16	6,9	100	4,0	57,9
SS18	7,3	100	7,0	95,8
SS20	7,4	100	6,9	93,2

Tablo 13. (devamı)

SS21	6,9	100	4,1	57,9
SS22	7,1	100	5,0	70,4
SS24	6,9	100	4,3	62,3
SS28	7,2	100	6,7	93
SS29	7,0	100	6,2	88,5
SS30	6,9	100	6,1	86,9
SS33	7,3	100	7,0	95,8
SS34	7,0	100	4,7	67,1
SS35	7,0	100	5,2	74,2
SS38	7,6	100	7,2	94,7
SS45	7,2	100	4,8	66,6



Şekil 14. SS18 kodlu izolatın pepsin varlığında gelişim gösterdiği petri görüntüsü



Şekil 15. SS38 kodlu izolatın pankreatin varlığında gelişim gösterdiği petri görüntüsü



Şekil 16. SS29 kodlu izolatın safra tuzu varlığında gelişim gösterdiği petri görüntüsü

Laktik Asit Bakteri İzolatlarının B12 Vitamini Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi

İzolatların B12 vitamini üretim potansiyelleri, yapılan HPLC analizi sonucunda belirlendi. Bu amaçla öncelikle analizin gerçekleştirilmesi için standart kalibrasyon eğrisi hazırlandı. Standart olarak $\geq$ % 98 saflıktaki B12 ($C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$, SIGMA) vitamin standardı kullanıldı. Daha sonra yine B12 vitaminine ait kromatogram görüntüsü elde edildi ve ölçümü yapılan izolatların da B12 vitamin içeriği kantitatif olarak hesaplandı. Bu doğrultuda referans olarak ; B12 vitamini kalibrasyon eğrisi ve B12 standardına ait kromatogram görüntüsünden yararlanıldı. Sonuçlar; “mg/L” olacak şekilde kantitatif bir değerle ortaya konuldu. Analiz; düşük pH'lara direnç gösteren 20 izolata (SS1, SS6, SS9, SS10, SS11, SS15, SS16, SS18, SS20, SS21, SS22, SS24, SS28, SS29, SS30, SS33, SS34, SS35, SS38 ve SS45) uygulandı. Sonuç olarak; SS1, SS6, SS9, SS11, SS15, SS16, SS18, SS20, SS22, SS24, SS30,

SS33, SS34, SS35 ve SS45 kodlu 15 adet izolatın “mg/L” cinsinden belli oranlarda B12 vitamini ürettiği görüldü. Bu 15 izolata ait B12 vitamini üretiminin HPLC ile belirlenen kantitatif sonuçları Tablo 14’te verilmiştir.

Tablo 14. İzolatların B12 Vitamini Üretebilme Potansiyelleri

İzolat Kodu	B12 Vitamin (mg/L)
SS1	1,290
SS6	1,874
SS9	1,084
SS10	0.000
SS11	1,748
SS15	1,289
SS16	1,590
SS18	1,529
SS20	1,515
SS21	0.000
SS22	1,473
SS24	1,101
SS28	0.000
SS29	0.000
SS30	1,375
SS33	1,444
SS34	1,438
SS35	1,474
SS38	0.000
SS45	1,248

Laktik Asit Bakteri İzolatlarının β -Galaktosidaz (Laktaz) Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

İzolatların β -galaktosidaz (laktaz) üretim potansiyellerinin belirlenmesi kapsamında ilk aşamada; laktozlu ortamda aktivite ölçümü gerçekleştirildi ve elde edilen sonuçlar yorumlanarak izolatların β -galaktosidaz (laktaz) aktivitesi “U/ml” cinsinden kantitatif olarak belirlendi. β -galaktosidaz enzim aktivitesinin tespiti amacıyla yapılan yöntem SS1, SS6, SS9, SS11, SS15, SS16, SS18, SS20, SS22, SS24, SS30, SS33, SS34, SS35, ve SS45 kodlu 15 adet izolata uygulandı. Elde edilen sonuçlara göre; yalnızca SS1, SS9, SS15, SS18, SS20, SS30 ve SS33 kodlu 7 izolatın β -galaktosidaz (laktaz) üretim potansiyeli olduğu gözlemlendi. 7 izolata ait elde edilen kantitatif sonuçlar Tablo 16’da verilmiştir. Kalan SS6, SS11, SS16, SS22, SS24, SS34, SS35, ve SS45 kodlu 8 adet izolatın ise; β -galaktosidaz (laktaz) aktivitesi çok düşük olduğu için tablo içerisinde bu izolatların aktivitesi; “ β -galaktosidaz (laktaz) aktivitesi yoktur” anlamında “-” işareti kullanılarak gösterildi.

Tablo 15. İzolatların β -galaktosidaz (laktaz) Aktiviteleri

İzolat Kodu	β -galaktosidaz (laktaz) (U/mL)
SS1	13,2
SS6	-
SS9	15,1
SS11	-
SS15	13,6
SS16	-
SS18	13,1
SS20	14,6
SS22	-
SS24	-
SS30	13,8
SS33	14,4
SS34	-
SS35	-

Tablo 15. (devamı)

SS45	-
------	---

İzolatların β -galaktosidaz (laktaz) enzim aktivitesini belirlemek amacıyla ikinci aşamada ise; API ZYM test kitinden yararlanıldı ve β -galaktosidaz (laktaz)'ın yanısıra izolatların çeşitli enzim profilleri ortaya konuldu. API ZYM test kiti ile kurulan reaksiyon stripleri 24-48 saat boyunca 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından ZYMA ve ZYMB reaktifleri kullanılarak sonuçlar, bioMérieux firmasına ait API ZYM test kitinin okuma tablosuna göre değerlendirildi (Şekil 17). Reaktiflerle meydana gelen reaksiyon sonucunda oluşan renkler, okuma tablosundan yararlanılarak değerlendirildi ve izolatların ilgili kuyucuktaki enzim aktiviteleri pozitif (+) veya negatif (-) olarak kaydedildi. API ZYM test kiti okuma tablosuna göre; β -galaktosidaz (laktaz)'ın olduğu 14 numaralı kuyunun β -galaktosidaz (laktaz) enzim varlığında menekşe-mor rengine bürünmesi beklenmektedir. Bundan hareketle kuyuda menekşe-mor renk gösteren izolatlar, β -galaktosidaz (laktaz) enzim aktivitesi açısından pozitif olarak seçildi. API ZYM test striplerinde β -galaktosidaz (laktaz)'ın pozitif olduğu izolata ait strip Şekil 18'de ; negatif olduğu izolata ait strip ise Şekil 19'da verilmiştir. Sonuçlara göre SS1, SS9, SS15, SS18, SS20, SS30 ve SS33 kodlu 7 izolatın β -galaktosidaz (laktaz) aktivitesi açısından pozitif olduğu ortaya konuldu. Diğer deneylere bu 7 izolat üzerinden devam edildi.

OKUMA TABLOSU					
No.	TEST EDİLEN ENZİM	SUBSTRATLAR	pH	SONUÇ	
				POZİTİF	NEGATİF
1	Kontrol			Renksiz veya yoğun renklenmeye sahip ise numune rengi	
2	Alkaline phosphatase	2-naphthyl phosphate	8.5	Menekşe rengi	Renksiz veya Çok açık sarı *
3	Esterase (C 4)	2-naphthyl butyrate	6.5	Menekşe rengi	
4	Esterase Lipase (C 8)	2-naphthyl caprylate	7.5	Menekşe rengi	
5	Lipase (C 14)	2-naphthyl myristate	+	Menekşe rengi	
6	Leucine arylamidase	L-leucyl-2-naphthylamide	+	Turuncu	
7	Valine arylamidase	L-valyl-2-naphthylamide	+	Turuncu	
8	Cystine arylamidase	L-cystyl-2-naphthylamide	+	Turuncu	
9	Trypsin	N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide	8.5	Turuncu	
10	α -chymotrypsin	N-glutaryl-phenylalanine-2-naphthylamide	7.5	Turuncu	
11	Acid phosphatase	2-naphthyl phosphate	5.4	Menekşe rengi	
12	Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	Naphthol-AS-BI-phosphate	+	Mavi	
13	α -galactosidase	6-Br-2-naphthyl- α -D-galactopyranoside	+	Menekşe rengi	
14	β -galactosidase	2-naphthyl- β -D-galactopyranoside	+	Menekşe rengi	
15	β -glucuronidase	Naphthol-AS-BI- β -D-glucuronide	+	Mavi	
16	α -glucosidase	2-naphthyl- α -D-glucopyranoside	+	Menekşe rengi	
17	β -glucosidase	6-Br-2-naphthyl- β -D-glucopyranoside	+	Menekşe rengi	
18	N-acetyl- β -glucosaminidase	1-naphthyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide	+	Kahverengi	
19	α -mannosidase	6-Br-2-naphthyl- α -D-mannopyranoside	+	Menekşe rengi	
20	α -fucosidase	2-naphthyl- α -L-fucopyranoside	+	Menekşe rengi	

Şekil 17. API ZYM okuma tablosu (bioMérieux)



Şekil 18. β -galaktosidaz (laktaz) aktivitesi gösteren izolata ait API ZYM test stripi



Şekil 19. β -galaktosidaz (laktaz) aktivitesi göstermeyen izolata ait API ZYM test stripi

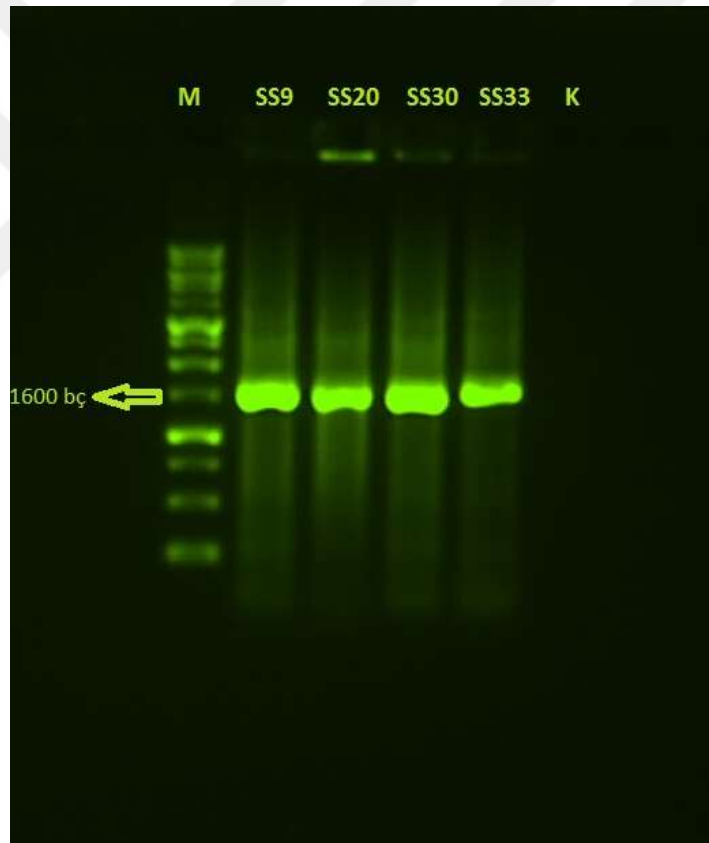
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Kolesterolü Düşürme Potansiyellerinin Belirlenmesi

İzolatların kolesterolü düşürme yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla; kolesterolü parçalama potansiyeline sahip olan “kolesterol oksidaz” enziminin ekspresyonundan sorumlu olan genin ait genin, bu dört izolatta (SS9, SS20, SS30, SS33) olup olmadığı araştırıldı. Kolesterol oksidaz (CHO) genine ait primerlerle

(CHO Forward: 5'-ATACTGCAGATGACCGATAGCCGGGCGAACA-3'

CHO Reverse: 5'-ATAAAGCTTTCACTGGATGTCGGACGAGATG-3')

spesifik PCR analizi yapıldı. Analiz sonucunda 1500-1600 bp (baz çifti) uzunluğundaki kolesterol oksidaz (CHO) genini, SS9, SS20, SS30 ve SS33 kodlu dört izolatın da barındırdığı görüldü. Bu izolatlara ait kolesterol oksidaz (CHO) geni bant görüntüleri Şekil 20’de verilmiştir.



Şekil 20. SS9, SS20, SS30 ve SS33 kodlu izolatlara ait Kolesterol Oksidaz (CHO) genine ait bant profili (M: Markır, K: Kontrol)

İzolatların kolesterolü düşürme yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla uygulanan bir diğer yöntemde ise; izolatların kolesterol (C4951, Sigma-Aldrich) içeren MRS ve M17 broth besiyerleri içerisine inokülasyonu yapıldı. Gerekli koşullar sağlandıktan sonra kolesterol miktarındaki azalma, 550 nm’de karışımların absorbanslarının ölçülmesi ile belirlendi. Elde edilen absorbanslar ile kontrol ortamının kolesterol içeriği karşılaştırılarak, izolatların

kolesterol düşüşüne olan etkileri yüzde olarak hesaplandı. Bu düşüşler; azalan kolesterol miktarı olarak kabul edildi ve yüzde olarak hesaplandı. Sonuçta, β -galaktosidaz (laktaz) aktivitesine de sahip olan; SS1, SS9, SS15, SS18, SS20, SS30 ve SS33 kodlu 7 adet izolattan, SS9, SS20, SS30 ve SS33 kodlu 4 adet izolata kolesterol düşüşüne etkisinin olduğu tespit edildi. Bu dört izolata ait kolesterol miktarındaki düşüşler Tablo 16’da yüzde olarak verilmiştir.

Tablo 16. İzolatların Kolesterol Düşürücü Etkileri

İzolat Kodu	Kolesterol miktarındaki düşüş (%)
SS9	80,2
SS20	74,6
SS30	73,1
SS33	74,7

Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Linoleik Asit Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi

İzolatların linoleik asit üretim potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışma, gen seviyesinde gerçekleştirildi. Bu amaçla izolatların; linoleik asit üretiminden sorumlu olan ve linoleik asiti (LA), konjüge linoleik asite (CLA) dönüştüren LA1 genini barındırıp barındırmadıkları, LA1 genine ait primerlerle

(LISO3:5’- CGGACNTACGTYGAYTTAATGG-3’

LISO4: 5’-TGGTGMACMACRATCGACAT-3’)

gerçekleştirilen spesifik PCR işlemi sonucunda belirlendi. PCR işlemi dört izolata (SS9, SS20, SS30 ve SS33) uygulandı. Sonuç olarak özellikle SS9 kodlu izolata güçlü, SS20 kodlu izolata ise zayıf linoleik asit üreticisi olduğu kanısına varıldı. SS30 ve SS33 kodlu izolatlarda ise LA1 genine ait herhangi bir bant görüntüsü elde edilemedi. Buradan da; bu iki izolata (SS30 ve SS33) linoleik asit üreticisi olmadığı anlaşıldı. Elde edilen PCR bant profilleri Şekil 21’ de verilmiştir.



Şekil 21. SS9, SS20, SS30 ve SS33 kodlu izolatların Linoleik Asit (LA1) genine ait bant profili (M: Markır, K: Kontrol)

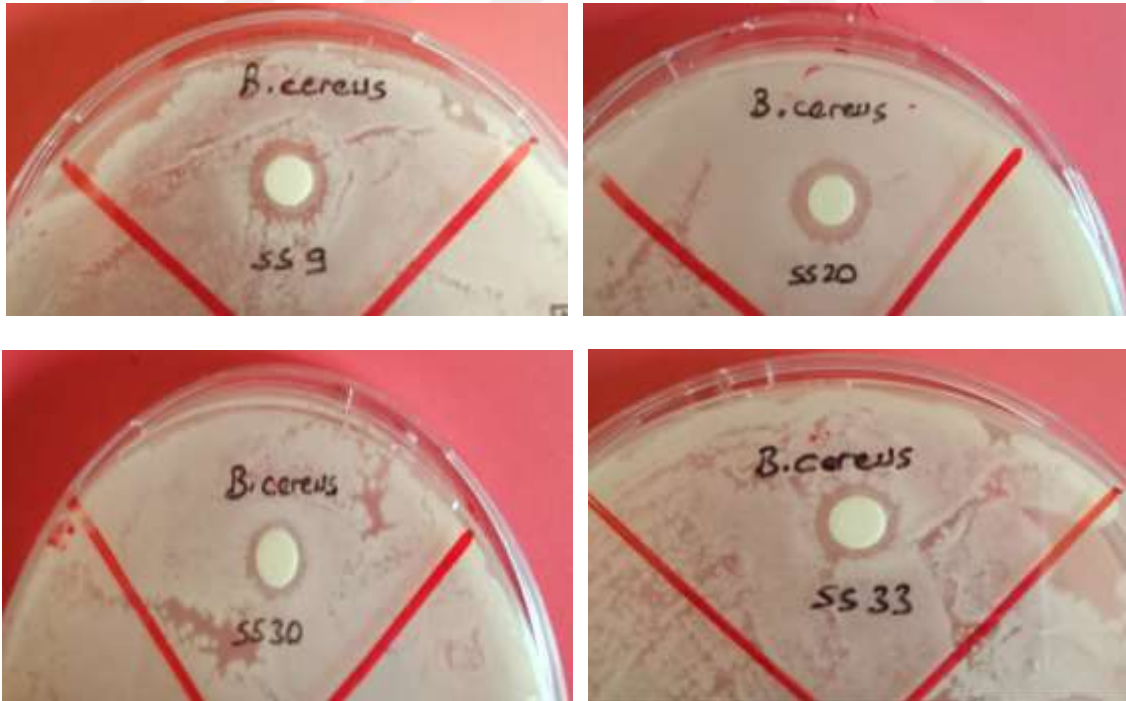
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

İzolatların antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla disk difüzyon yöntemi kullanıldı. Bu amaçla altı farklı gıda patojeni bakteri [*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Gram +), *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (Gram +), *Bacillus cereus* ATCC 11778 (Gram +), *Salmonella typhi* ATCC 13076 (Gram -), *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram -), *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715 (Gram -)], iki farklı gıda patojeni fungus (*Candida albicans* ATCC 14053 , *C. glabrata* ATCC 2001) ve bir adet gıda patojeni küf (*Aspergillus niger* ATCC16888) tercih edildi. Özellikle son aşamada probiyotik olma potansiyeli açısından tüm aşamalarda pozitif sonuç elde edilen; SS9, SS20, SS30 ve SS33 kodlu dört adet izolatın antimikrobiyal aktiviteleri araştırıldı. Suşların hepsinin çeşitli gıda patojenlerine karşı farklı seviyede antagonistik etki gösterdiği belirlendi. Yapılan disk difüzyon yöntemi neticesinde; SS9 ve SS20 kodlu izolatın; *Salmonella typhi* ATCC 13076, *Listeria monocytogenes* ATCC, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715'e, SS30 kodlu izolatın; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella typhi* ATCC 13076, *Listeria monocytogenes* ATCC, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *E Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715'e, SS33 kodlu izolatın ise; *Salmonella typhi* ATCC 13076, *Listeria monocytogenes* ATCC, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia*

coli ATCC 25922, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715'e karşı antagonistik etki gösterdiği tespit edildi. İzolatların antimikrobiyal potansiyellerini göstermek amacıyla ölçülen inhibisyon zonları Tablo 17'de verilmiştir. Tüm izolatların yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği ve geniş inhibisyon zonlarının elde edildiği *Bacillus cereus* gıda patojenine ait antimikrobiyal analiz sonuçları da Şekil 22'de verilmiştir. İzolatların antifungal potansiyellerinin belirlenmesi için yapılan disk difüzyon metodu neticesinde ise *Candida albicans* ATCC 14053 , *C. glabrata* ATCC 2001 ve *Aspergillus niger* ATCC16888 etrafında inhibisyon zonlarının oluşmadığı ve hiçbir izolatın antifungal etki göstermediği tespit edildi.

Tablo 17. Antimikrobiyal Analiz Sonuçları (İnhibisyon zonları (mm))

İzolat Kodu	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
SS9	9 mm	-	5 mm	10 mm	8 mm	6 mm
SS20	9 mm	-	10 mm	11 mm	7 mm	8 mm
SS30	9 mm	9 mm	8 mm	11 mm	8 mm	9 mm
SS33	6 mm	-	7 mm	10 mm	9 mm	8 mm



Şekil 22. İzolatların antimikrobiyal etkileri [(İnhibisyon zonları (Petri görüntüsü))

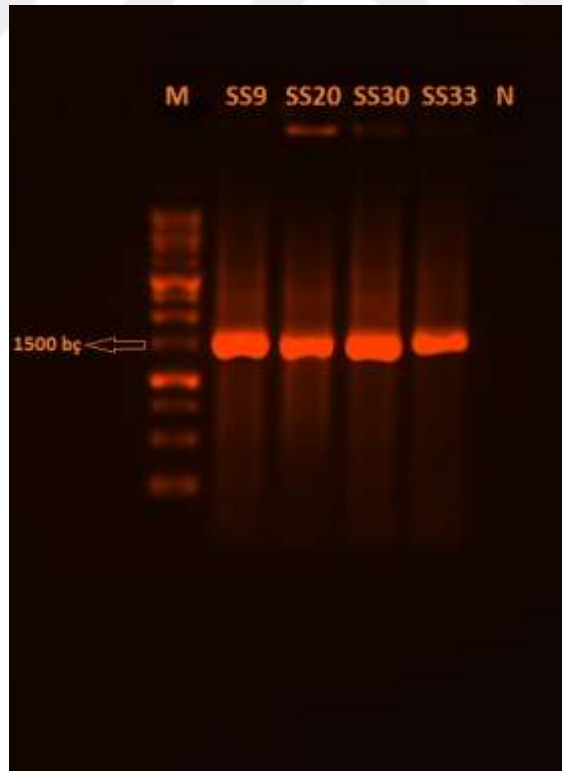
Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Virölans Genlerinin Sepesifik PCR ile Belirlenmesi

İzolatların virölans genleri barındırıp barındırmadıkları, spesifik PCR ile araştırıldı. Gıda patojenlerine karşı antagonistik etki gösteren SS9, SS20, SS30 ve SS33 kodlu izolatların patojeniteleri, virölans belirleyicileri olan *asa1*, *cylA*, *esp*, *gele* ve *hyl* genlerinden yararlanılarak belirlendi. Sonuç olarak izolatlardan hiçbirinin belirtilen virölans genleri barındırmadıkları PCR sonucu ile gözlemlendi. Bu genleri barındırmadıklarından dolayı belirtilen 4 adet izolatın da patojen suşlar olmadığı ve probiyotik açıdan güvenli suşlar olduğu sonucuna varıldı.

Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Moleküler İdentifikasyonu

İzolatların 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılması

SS9, SS20, SS30 ve SS33 kodlu izolatların moleküler idenfikasyonu amacıyla öncelikle; 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılması işlemi gerçekleştirildi. Analiz sonucunda dört izolatın 16S rRNA gen bölgesi PCR yardımı ile çoğaltıldı. Bu dört izolata ait PCR bant profili Şekil 23'de verilmiştir.



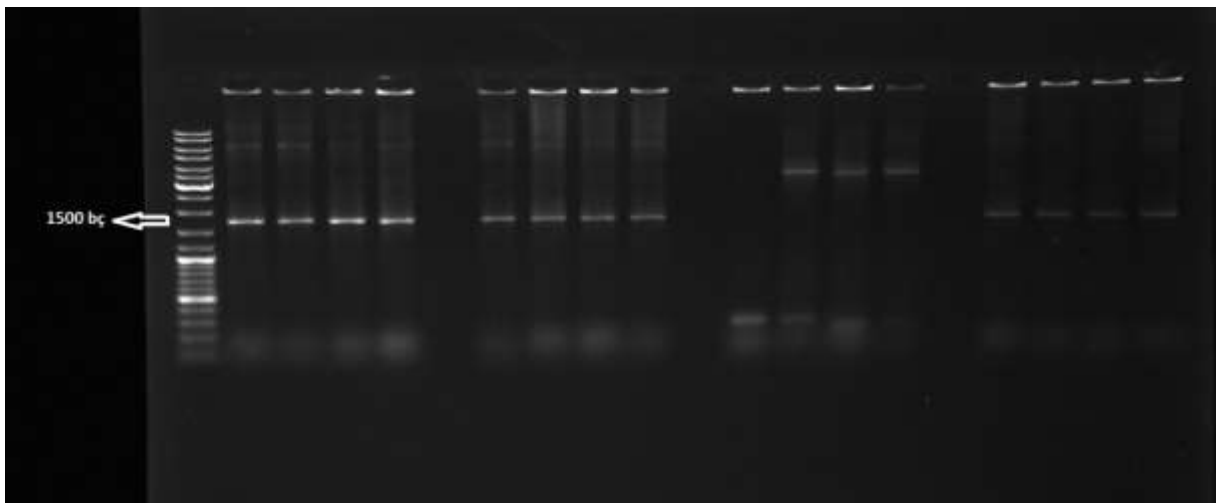
Şekil 23. İzolatlara ait 16S rRNA PCR bant görüntüsü (M: markır, N: Negatif Kontrol)

16S rRNA gen bölgesinin klonlanması

İzolatların moleküler olarak tanımlanması için; amplifiye edilen 16S rRNA gen bölgesinin nükleotid dizisini belirlemek amacıyla, klonlama çalışması yapıldı. Bu kapsamda elde edilen 16S rRNA gen bölgesinin pGEM®-T Easy (Promega) vektörüne ligasyonu ve bu ligasyon ürününün uygun kompetent *E. coli* hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi. Analizin başarısı mavi-beyaz tarama ile belirlendi (Şekil 24). Mavi koloniler; 16S rRNA gen bölgesinin transformasyon aşamasında insert olmadığı, beyaz koloniler ise; 16S rRNA gen bölgesinin transformasyon aşamasında insert olduğu kolonileri işaret etti. Bunun doğruluğunu kanıtlamak için beyaz kolonilere koloni PCR işlemi uygulandı. PCR sonucunda bant profili doğru olan koloniler seçildi (Şekil 25) ve plazmit izolasyonu yapılarak, sekans analizi gerçekleştirildi (Macrogen, Hollanda).



Şekil 24. Mavi beyaz tarama



Şekil 25. İzolatların koloni PCR bant profilleri (M: Markır, N: Negatif Kontrol)

16S rRNA sekans analizi

Plazmit izolasyonu yapılan ve sekans analizi yaptırılan izolatların bu analiz sayesinde 16S rRNA gen dizileri belirlendi. Belirlenen diziler GenBank^R veritabanında bulunan tüm diğer 16S rRNA gen dizleriyle kıyaslandı. Bu kıyaslama sonucunda da eldeki dört izolatın 16S rRNA gen dizilerine göre tür isimleri ve benzerlik oranları belirlendi. Son olarak identifiye edilen bu izolatların verileri GenBank^R a girilerek, herbir izolat için accession numarası alındı (Tablo 18).

Tablo 18. İzolatların 16S rRNA Dizi Analiz Sonuçları

İzolat Kodu	Benzediği Tür İsmi	Benzerlik Oranı	Genbank Numarası
SS9	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	%99	OQ346334
SS20	<i>Pediococcus acidilactici</i>	%99	OQ346335
SS30	<i>Enterococcus durans</i>	%99	OQ346337
SS33	<i>Enterococcus durans</i>	%99	OQ346336

Probiyotik Potansiyelli Olduğu Düşünülen İzolatlara Ait Tüm Parametrelerden Elde Edilen Sonuçlar

Potansiyel probiyotik izolat olduğu düşünülen suşlara ait, fenotipik karakterizasyon sonuçları Tablo 19’da, bu aşamaya kadar gerçekleştirilen analizler sonucunda elde edilen tüm veriler Tablo 20’de verilmiştir.

Tablo 19. SS9, SS20, SS30 ve SS33 Kodlu İzolatların Fenotipik Karakterizasyon Sonuçları

İzolat Kodu	Morfoloji	Gram	Endospor	Oksidaz	Katalaz	Glikozdan Gaz Üretim
SS9	Tipik görünümlü	+	-	-	-	Heterofermanttif
SS20	Tipik görünümlü	+	-	-	-	Heterofermanttif
SS30	Tipik görünümlü	+	-	-	-	Heterofermanttif
SS33	Tipik görünümlü	+	-	-	-	Heterofermanttif

Tablo 20. SS9, SS20, SS30 ve SS33 Kodlu İzolatların Tüm Parametrelere Ait Elde Edilen Sonuçları

Kod	Hemolitik aktivite	Gastrointestinal Koşullara Direnç (%)			B12 (mg/L)	β-galaktosidaz		Kolesterol Miktarındaki Düşüş		LA (Linoleik Asit)	Virülans Genler
		Pepsin (pH 2)	Pankreatin (pH 8)	Safra (%3)		U/mL	API ZYM	%	CHO geni	(LA1 geni)	
SS9	γ-hemolitik	86.9	>100	89.8	1.084	15.1	+	80.2	+	+	-
SS20	γ-hemolitik	90.5	>100	93.2	1.515	14.6	+	74.6	+	+	-
SS30	γ-hemolitik	72.4	>100	86.9	1.375	13.8	+	73.1	+	-	-
SS33	γ-hemolitik	98.6	>100	95.8	1.444	14.4	+	74.7	+	-	-

TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Tartışma

Probiyotikler, uygun bir konsantrasyonda alındığında konakçı üzerinde çeşitli sağlık yararına etkiler gösteren, canlı mikroorganizmalardır. Bilinen probiyotik mikroorganizmalar arasında, LAB türleri (örneğin; *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* ve *Enterococcus*), *Bifidobacterium* türleri sayılabilir ve bu mikroorganizma grubu probiyotik olma açısından güvenli türler olarak kabul edilmiştir. Bu mikrobiyal gruplar, insan vücudunun olumsuz koşullarına (örneğin; tükürük enzimleri, düşük pH ve pankreas suyu) dayanma, bağırsak epitel hücrelerini kolonize etme ve mikropları düzenleyerek, onlara biyolojik işlevler uygulayarak konakçı ortamının sağlığına katkıda bulunma yeteneğine sahiptir. Dünya çapında, özellikle gıda mikrobiyolojisi ve gıda endüstrisi alanında artan sayıda bilimsel çalışmalar; farklı ve spesifik fonksiyonel özelliklere sahip yeni suşların seçimine ihtiyaç duymaktadır. Bu amaçla, yeni mikrobiyal gruplar ve daha spesifik LAB suşları sürekli olarak belirlenmektedir. Bu yeni mikroorganizmalar, ürün geliştirme için mikroorganizmaların güvenli bir izolasyon kaynağı olarak kabul edilmeleri nedeniyle genellikle insanlardan izole edilir. Bununla birlikte, şu anda süt ürünleri, meyveler, tahıllar ve atıklar gibi yeni izolasyon kaynakları da kullanılmaktadır (de Melo Pereira 2018).

Hedef fonksiyonların ve teknolojik uygulamaların probiyotik yelpazesi nedeniyle, yeni probiyotik adaylarının seçimi ve değerlendirilmesi, birden çok adımı içeren kapsamlı bir yaklaşım gerektirir. 2002'den önce, probiyotik mikroorganizmaların etkinliğini ve güvenliğini onaylayan uluslararası bir düzenleme bulunmadığından FAO/WHO, probiyotikler için güvenlik ve etkinlik standartlarını belirleyen “Gıdalarda Probiyotiklerin Değerlendirilmesine Yönelik Yönergeler”i yayınlamıştır. Bu kılavuzda, insan vücudunun elverişsiz koşullarına direnç, bağırsak epitel yüzeyine tutunma yeteneği, antimikrobiyal aktivite ve güvenlik değerlendirmesi dahil olmak üzere probiyotik seçimi için çeşitli kriterler önerilmektedir. Mikroorganizmaların insan sağlığı için kullanılabilecek probiyotik organizmalar olarak seçilebilmesi için yeni stratejiler üretilmiştir. Bunlar; antikarsinogenik, anti depresyon, anti obezite, anti diyabetik, kolesterol düşürücü aktiviteler gibi probiyotiklerin biyolojik özellikleri ve virülans, toksisite, antibiyotik direncine sahip olmayan güvenli probiyotik mikroorganizmalara ait özellikler olarak belirlenmiştir (Zoumpopoulou *et al.* 2017).

Elimizdeki verilere göre; kaynak olarak belirlenen sucuk ve peynir örneklerinden izole edilen LAB' nin probiyotik potansiyelleri, hem insan sağlığı açısından güvenilir olması yönüyle hem de metabolik yolaktaki performansı açısından kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır.

Öncelikle probiyotik LAB belirlemek amacıyla çeşitli kaynaklardan bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Probiyotik olarak kullanılan LAB genellikle süt, peynir, yoğurt, fermente sucuk ve fermente sosis gibi fermente gıda kaynaklarından elde edilmektedir. LAB, ağız florasında kolonize olurken (oral streptokoklar), bazıları bağırsak mikrobiyotasında (bifidobakteriler, enterokoklar ve bazı laktobasiller) ve bazıları da vajinal mikrobiyotada kolonize olmaktadır. Bunların yanısıra fermente gıdalar olarak bilinen günlük diyetle yer alan yoğurt, peynir, zeytin, turşu gibi gıdalar da; LAB için, özellikle probiyotik bakteriler için önemli kaynaklardır (Sirichokchatchawan *et al.* 2018; Sharma *et al.* 2019; Yelnetty *et al.* 2020). Bu çalışmada; probiyotik potansiyelli LAB' ni izole etmek amacıyla fermente gıda kaynaklarından sucuk ve peynir tercih edilmiştir. İzolat sayısının fazlalığı tüm izolatların LAB olabileceği konusunda şüpheler uyandırdığından fenotipik karakterizasyonla (Gram özellikleri, endospor varlığı, oksidaz ve katalaz enzimi varlığı, glikozdan gaz üretim potansiyelleri) izolatlar ön seçime tabi tutularak izolatların büyük bir çoğunluğunun LAB olabileceği düşüncesi kuvvetlenmiştir.

Laktik asit bakterilerinin probiyotik olarak kullanılabilmesi için güvenli suş kabul edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla güvenli suş denilebilecek suşların insan ve hayvan kanını hidroliz etmemesi yani hemolitik aktiviteye sahip olmaması gerekir (Park *et al.* 2019). Literatürde probiyotik potansiyeli olan tüm izolatların hemolitik aktiviteye sahip olmadığı fakat kısmi hidrolize sebep olan bazı suşların da bulunduğu belirtilmiştir. *Lentilactobacillus plantarum* suşunun ekşi hamur fermentasyonunda hem probiyotik hem de starter kültür olarak kullanılabilirliğinin araştırıldığı bir çalışmada belirtilen suşun starter olarak kullanılabilmesi için probiyotik potansiyelli ve gıda güvenliği açısından uygun olması gerektiği düşünülmüş ve öncelikle hemolitik aktivitesine bakılmıştır. Elde edilen veriler incelendiğinde *Lentilactobacillus plantarum* suşunun; β -hemolitik olmadığı yani kısmi hidrolize bile sebep olmadığı gözlemlenmiş ve belirtilen suş güvenli suş olarak kabul edilmiştir. Bu çalışmada ise; elde edilen izolatların hemolitik aktiviteleri incelendiğinde; 80 izolatın 5 tanesinin β -hemolitik, 75 adetinin ise γ -hemolitik aktivite gösterdiği yani güvenli suşlar olarak kabul edilebileceği gözlenmiştir.

Probiyotik mikroorganizmaların metabolik yolda bağırsak yoluna ulaşmadan önce, mideden geçerken canlı kalıp kalmadıklarının tespit edilmesi önemli bir kıstas olmuştur. Bu ortamın asidik bir pH değerine sahip olması durumu, probiyotik olarak kullanılacak bakterilerin düşük

pH' ya karşı yüksek dirence sahip olması gerektiğini öngörmüştür. pH 2 civarında test edilen izolatların gösterdiği direnç, elde edilen koloni sayılarından yola çıkılarak hesaplanmış ve sonuçlar yüzde olarak verilmiştir (Ahire *et al.* 2021; Stivala *et al.* 2021). Literatürde probiyotik potansiyeli araştırılan LAB' nin düşük pH' ya direnci genelde pH: 2, pH: 2,5 gibi mide ortamı pH'sına yakın tek bir ortamda test edilmiştir. *Lactobacillus* cinsine ait türlerin probiyotik potansiyelinin araştırıldığı ve bu bağlamda özellikle mide ortamına yakın pH 2'de canlılığını sürdürebilirliği araştırıldığında; bu türlerin %50 oranında düşük pH' ya dirençli olduğu (Abouloifa *et al.* 2020); yine farklı bir çalışmada antifungal *Lactobacillus* türlerinin pH 2,5' da canlılık yüzdesi hesaplanmış ve maksimum % 65.20 oranında canlılık yüzdesine sahip olduğu bildirilmiştir (Wei *et al.* 2019). Bu çalışmada ise elde edilen yerel izolatların tümünün pH 1, 2, 3 ortamlarında büyüme, hayatta kalabilme oranları spektrofotometrik olarak OD600 nm de ölçülmüş ve toplamda 20 adet izolatın her üç ortamda da 0,3 ile 1.2 arasında değişen büyüme oranına sahip olduğu gözlenmiştir.

Muhtemel probiyotik mikroorganizmaların mideyi geçebilme yani gastrointestinal koşullarda hayatta kalabilme yeteneklerinin ortaya konulması, bu mikroorganizmaların çeşitli sindirim enzimlerine karşı olan toleransını belirlemeyle anlaşılmaktadır. Bunu tespit etmek için günümüzde mide simülasyon çözeltileri kullanılmakta ve sindirim modellerinde en çok sindirim enzimleri (pankreatin, pepsin, tripsin, kimotripsin, peptidaz, amilaz, lipaz), safra tuzu ve müsin tercih edilmektedir (Minj *et al.* 2021). Pepsin; mide özsuyundaki proteinli yiyeceklere etki eden kuvvetli bir enzimdir. Mide duvarında bulunan inaktif pepsinojen ile, mide özsuyunda bulunan hidroklorik asidin tepkimesi sonucu oluşan pepsin; otokataliz ile aktif bir enzime dönüşür. Pankreatin ise; pankreasın ekzokrin hücrelerinden sentezlenen amilaz, lipaz ve proteaz gibi sindirim enzimlerinin tümünü içermektedir. Pankreatinin; besin alerjileri, çölyak hastalığı, otoimmün hastalıklar, kanser ve kilo kaybı gibi sorunlara faydalı olduğu bildirilmiştir (Pei *et al.* 2021; Petrova *et al.* 2022). Sindirim sisteminde antimikrobiyal etkili mekanizmalardan bir tanesi olan en önemli sindirim elemanlarından biri de safra tuzlarıdır. Safra asidi, karaciğerde kolesterolden sentezlenir ve safra kesesinden konjuge formda on iki parmak bağırsağına gönderilir. Bu asitler, çoğunlukla mikrobiyal aktivite sonucunda kolonda kimyasal modifikasyonlara (dekonjügasyon, dehidroksilasyon, dehidrojenasyon) uğramakta, bakterilerin büyük oranda lipit ve yağ asidi içeren hücre membranlarına zarar vererek inhibitör etkisi yapmaktadırlar. Mikroorganizmaları etkileyen bu özelliklerinden dolayı, muhtemel probiyotik suşların bağırsaklarda fonksiyon gösterebilmeleri için pepsin, pankreatin ve safra tuzu gibi sindirim elemanlarına karşı dirençli olmaları gerekmektedir (Mosso *et al.* 2018; Pérez *et al.* 2022). Bu bağlamda literatür verileri incelendiğinde, Sornsen ve arkadaşları (2021) tarafından yapılan bir çalışmada; *Lactobacillus* türlerinin probiyotik özellikleri incelenmiş ve

bu türlerin gastrointesinal koşullara dirençleri yüzde olarak belirlenmiştir. Çalışılan türler içerisinde pepsin direncinin maksimum %54.77, pankreatine olan direncin % 100 den fazla olduğu, safra tuzuna olan direncin ise maksimum % 52.56 olduğu görülmüştür. Pepsin ve safra tuzlarına olan toleransın pankreatinden daha düşük olduğu gözlenmiştir (Sornsenee *et al.* 2021). Bir başka çalışmada yine; kimchi'den izole edilen *Lactobacillus plantarum* LRCC5193 türünün probiyotik özellikleri ve çikolatalarda kullanımı araştırılmış, bu bağlamda belirtilen türün gastrointesinal koşullara dayanıklılık oranları yüzde olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre belirtilen türün pepsine, pankreatine ve safra tuzlarına olan direncinin sırasıyla % 96.3, 98.5, 84.2 olduğu bulunmuştur (Lim *et al.* 2018). Bu çalışmada ise; pepsine ve safra tuzlarına toleransın, karma bir sindirim enzimi olan pankreatine karşı toleranstan daha düşük olduğu; pepsin direncinin % 69.3 ile % 100 arasında, pankreatin direncinin %92.1 ile %100 arasında, safra tuzu toleransının ise %3 safra varlığında % 86.9 ile % 95.8 arasında değiştiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar; literatür verileri ile karşılaştırıldığında bazı literatür verileriyle uyumlu olduğu bazı literatür verilerine göre de daha güçlü dirence sahip suşların olduğunu ortaya koymuş ve gastrointesinal koşullara direncin belirlendiği izolatların muhtemel probiyotik suşlar olduğuna ve gösterdikleri bu direnç sayesinde bağırsaklarda probiyotik olarak fonksiyon gösterebileceklerine işaret etmiştir.

LAB' nin probiyotik potansiyelli bakteriler olup olmadığının belirleyici kıstaslarından biri de B12 vitamini üretim potansiyeline sahip olmalarıdır. B12 vitamini (kobalamin), suda eriyen, insanda kalın bağırsakta ve ince bağırsakta bakteriler tarafından sentezlenen bir proteindir (Molae Parvare *et al.* 2021). Mikroorganizmalar tarafından sentezlenen B12 miktarı, bağırsak florasının değişkenliği ve sentezlenen vitaminin emilim azlığı nedeniyle vücudun gereksinimini karşılamaz. Bundan dolayı insanlar B12 vitaminini hayvansal kaynaklı besinler yoluyla almak zorundadırlar. Bu besinler sığır karaciğeri ve böbreği, et, yumurta, süt, peynir, yoğurt ile midye, istiridye, ahtapot, balık ve balık yumurtası gibi deniz ürünleridir (Lemos Junior *et al.* 2020). Belirtilen ürünlerin alınmaması ve oluşan B12 vitamini eksikliğinde; hematolojik bulgular, nörolojik bulgular ve gastrointesinal bulgular olarak bilinen, anemi, parestezi, ataksi, pozisyon hissinin kaybı, kas güçsüzlüğü, konsantrasyon güçlüğü, yorgunluk gibi durumlar ortaya çıkmaktadır (Behera *et al.* 2018). Tüm bunlardan hareketle probiyotik olarak kullanılacak bakterilerin B12 vitamini üretme potansiyeline sahip olması önerilmektedir. Literatür verileri incelendiğinde; özellikle LAB' nin B12 vitamini üretim potansiyellerinin olduğu ve bu bakterileri içeren hazır fermente gıdaların tüketimiyle dolaylı yoldan insanlara B12 vitamini sağlanabileceği belirtilmiştir (Dowarah *et al.* 2018). Bunun yanısıra bu bakteri grubunun probiyotik olarak doğrudan kullanılması sonucunda gastrointesinal kanalda B12 vitaminin sentezlendiği gözlenmiştir (Rajab *et al.* 2020). Buna örnek olarak yapılan bir çalışmada; B12

vitamini üreten *Lactobacillus plantarum* suşlarının karakterizasyonu ve probiyotik potansiyellerinin değerlendirilmesi kapsamında bu suşların, HPLC ile B12 vitamini üretme potansiyelleri kantitatif olarak belirlenmiştir. Belirtilen türe ait birkaç farklı suşun ortalama 60 ile 98 µg/L oranında B12 vitamini ürettiği tespit edilmiştir. Elde edilen oranın, belirtilen türün probiyotik olarak kabul edilmesinde oldukça anlamlı ve önemli bir değer olduğu rapor edilmiştir (Hatti-Kaul *et al.* 2018). Bu çalışmada ise; yine HPLC metodu ile belirlenen B12 üretim potansiyelleri, test edilen tüm izolatlar için mg/L cinsinden verilmiştir. 15 adet izolata ait sonuçlar incelendiğinde B12 vitamini üretim potansiyellerinin kantitatif olarak değerlendirildiği ve sonuçların 1,084 ile 1,874 mg/L arasında değişiklik gösterdiği gözlenmiştir. Sonuçların oldukça etkili ve anlamlı değerler içermesi, literatür verileriyle uyuşması hatta daha etkili oranlar elde edilmesi bu izolatların potansiyel probiyotik mikroorganizma oldukları düşüncesini kuvvetlendirmiştir. B12 vitamini ürettiği rapor edilen izolatların probiyotik bakteri olduklarının kanıtlanabilmesi amacıyla; özellikle insanlardaki laktoz intoleransı probleminin ortadan kaldırılması için gerekli olan β-galaktosidaz (laktaz) enzim aktivitesine sahip olup olmadıkları araştırılmış ve pozitif sonuç alınması, bu izolatların probiyotik bakteri olabilme ihtimalini yükseltmiştir. Probiyotik bakterilerin bağırsakta mikrobiyal dengeyi sağlaması, sindirime yardımcı olması, sindirim sistemi için birçok fonksiyonel madde üretmesi, laktoz intoleransı semptomlarını azaltması ve bazı bağırsak hastalıklarını düzenlemesi gibi etkilere sahip olması gerekir (Cheon *et al.* 2020; Suissa *et al.* 2022). Laktoz intoleransı olan kişilerde laktoz, sindirilmeden kalır ve bu durumda ozmotik denge bozularak bağırsak içerisinde sıvı ve elektrolit birikimi meydana gelir. Bu birikimden dolayı laktoz intoleransının başlıca belirtileri aşırı gaz, şişkinlik, bulantı ve ishal olarak karşımıza çıkar. Bu bağlamda probiyotik bakterilerin ince bağırsakta safra tuzlarının etkisiyle parçalanması sonucu bakteriyel laktazın serbest kalarak laktozu metabolize ettiği öne sürülmüştür (Hussain *et al.* 2021; Rai and Tamang 2022). Bu da probiyotik bakterilerin β-galaktosidaz (laktaz) enzim aktivitesine sahip olmalarından ileri gelmektedir (Minj *et al.* 2021). Literatür verileri incelendiğinde probiyotik potansiyelli bakterilerin β-galaktosidaz (laktaz) enzim aktivitesine sahip oldukları gözlenmiştir. Örneğin de Souza ve arkadaşlarının, Song ve arkadaşlarının, Rai ve Tamang' ın yapmış oldukları çalışmalarda izolatların probiyotik potansiyellerinin araştırılmasında probiyotik bakteri denilebilecek tüm izolatların β-galaktosidaz (laktaz) üreticisi olduğu rapor edilmiştir (de Souza *et al.* 2019; Song *et al.* 2019; Rai and Tamang 2022). Literatür verilerine paralel olarak yapılan bu çalışmada da yine 7 adet izolatın β-galaktosidaz (laktaz) aktivitesinin olduğu kanıtlanmıştır. Fakat literatür verilerinden farklı olarak bu potansiyelin birçok enzim sistemi de içerdiği bilinen API ZYM sistem ile belirlenmesi ve buradan elde edilen sonucun daha kanıtlayıcı bir veri olması, çalışmayı diğer

Çalışmalardan farklı kılmalıdır. Bu bağlamda; β -galaktosidaz (laktaz) aktivitesi, API ZYM analizi sonucunda 14. Kuyuda menekşe renginin oluşumu ile pozitif sonuç olarak karşımıza çıkmıştır.

Laktoz intoleransının iyileştirilmesi yolunda, laktozu parçalayan suşların özellikle kardiyovasküler hastalıklar gibi istenmeyen sağlık sorunlarına sebep olan; kan kolesterol seviyesinin yükselmesi durumunu engelleyici özelliğinin olması beklenmektedir (Ait Chait *et al.* 2021). Kolesterol, canlılar için önemli bir bileşendir ve hayvanlar alemindeki tüm canlıların hücre membranında bulunmaktadır. Kortikosteroidler, safra asitleri ve D vitamini gibi diğer steroidlerin yapısını oluşturan kolesterolün seviyesinin yükselmesi, özellikle kardiyovasküler hastalıklar açısından önemli bir risk faktörüdür (Li *et al.* 2019). Bu bağlamda literatür verileri incelendiğinde özellikle LAB kültürlerinin serum kolesterol seviyesini düşürücü etkilerinin olduğu belirtilmiştir (Öldak *et al.* 2020). Probiyotik potansiyelli LAB' nin bu etkilerini şu şekilde gerçekleştirdiği ileri sürülmüştür: Probiyotikler safra tuzlarını serbest asitlere parçalayarak intestinal sistemden hızlı bir şekilde uzaklaştırır. Serbest safra tuzları vücuttan atıldığı için, kolesterolden yeni safra asitlerinin sentezi, vücuttaki toplam kolesterol konsantrasyonunu düşürür. Ayrıca probiyotik laktik asit bakterileri asit üretimi sonucu pH'yı düşürerek, dekonjuge safra tuzları ile kolesterolün presipitasyonuna neden olurlar (Larsen *et al.* 2018; Son *et al.* 2018). Probiyotik bakterilerin kolesterolü düşürücü etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada; probiyotik potansiyelli olduğu düşünülen üç adet izolatın sırasıyla kolesterolü düşürme yüzdeleri %79, 84 ve 74 olarak kaydedilmiştir (Ait Chait *et al.* 2021). Yine yapılan başka bir çalışmada; *Lactobacillus* suşlarının kolesterol seviyesini düşürücü etkilerinin araştırılarak bu suşların probiyotik suşlar olduğu kanıtlanmaya çalışılmış ve potansiyel probiyotik olduğu bildirilen bir suşun safra tuzu dekonjugasyon yeteneği gösterdiği, bu doğrultuda da % 30, 9 oranında kolesterol seviyesini düşürdüğü kaydedilmiştir (Ayyash *et al.* 2020). Yapılan bu tez çalışmasında ise; safra tuzuna toleransı kanıtlanan ve farklı parametlerden pozitif sonuç alınan izolatların kolesterolü düşürücü ya da kolesterolü parçalayıcı etkileri hem deneysel hem de gen seviyesinde araştırılmış ve potansiyel probiyotik olduğu düşünülen dört adet izolatın (SS9, SS20, SS30 ve SS33) sırasıyla % 80.2, 74.6, 73.1 ve 74.7 oranında kolesterolü düşürdüğü gözlenmiştir. Elde edilen verilerin literatürle uyuşmasının yanısıra gen seviyesinde de bu durumun araştırılması ve kolesterolü parçaladığı bilinen kolesterol oksidaz (CHO) genini barındıran bu dört izolatın, bu noktada probiyotik olarak kullanılabilirliklerinin kanıtlanabileceği düşünülmüştür. Ayrıca izolatların kolesterolü düşürme yüzdelerinin de literatür verileriyle kıyasla oldukça yüksek olması, bu izolatların mutlak probiyotik bakteri olabileceği konusunda ümit vermektedir. Sonrasında; kolesterolü düşürdüğü gözlemlenen izolatların probiyotik potansiyellerinin kanıtlanması noktasında literatürde de kendine oldukça

az yer bulan linoleik asitleri konjüge linoleik asite dönüştürme potansiyelleri araştırılmıştır. Konjüge linoleik asit (KLA), yağ asidi zincirinde iki adet doymamış çift bağ içeren linoleik asidin (LA), geometrik izomerlerini ifade eden bir bileşiktir. KLA izomerleri birçok gıdada bulunduğu gibi geniş getiren hayvanlardan elde edilen et ve süt ürünlerinde de bulunmaktadır (Song *et al.* 2019). KLA'nın insanlarda kanseri önlediği, vücut yağlarını azalttığı, kalp ve damar hastalıklarını önlediği bildirilmiştir. LAB' nin, özellikle probiyotik LAB' nin bilinen özelliklerinin yanısıra KLA oluşumu ile antikanserojen aktiviteye sahip oldukları belirtilmiştir (Ahire *et al.* 2021). Literatürde var olan çalışmalar incelendiğinde Kishino ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada LAB' nin linoleik asitten (LA), konjüge linoleik asit (KLA) üretimi araştırılmış ve çalışılan suşlar arasında yalnızca bir suşun 40 mg/mL oranında KLA ürettiği görülmüştür (Kishino *et al.* 2002). Yine yapılan başka bir çalışmada LAB kültürlerinin olduğu ortama LA eklenip bu bakterilerin KLA üretim potansiyeli araştırılmıştır. Sonuçlar; LAB kültürlerinin 1000 mg/ml seviyesinde KLA ürettiklerini kantitatif olarak ortaya koymuştur (Ale *et al.* 2020). Bu çalışmada ise probiyotik potansiyeli araştırılan suşların LA' yı KLA' ya dönüştürme yetenekleri, bundan sorumlu olan genlerin varlığıyla tespit edilmiştir. LA1 genini barındıran iki adet suşun olduğu gözlenmiştir. KLA üretiminin gen seviyesinde belirlenmesine literatürde çok az rastlanmıştır fakat bu çalışmada bu yöntem; izolatin KLA üretiminin kesin kanıtını ortaya koymuştur. Probiyotik potansiyelli bakteri olma konusunda oldukça seçici bir kıstas olan KLA üretimini bu çalışmada özellikle gen seviyesinde kanıtlanması yine bu suşların mutlak probiyotik bakteri olabileceğini düşündürmüştür.

WHO' ya göre bir mikroorganizmanın, probiyotik olup olmadığı belirlenmeden önce fenotipik ve genotipik bazı metotlar kullanılarak tanılama işlemi gerçekleştirilmelidir. Fenotipik testlerin hem güvenilir olmaması hem de fazla zaman almasından dolayı, son zamanlarda, fenotipik testlerin yerine geçebilen, daha hızlı ve güvenilir olan DNA/RNA bazlı genotipik tanı metodları kullanılmaktadır. Bunlar; 16S rRNA dizi analizi gibi PCR temelli yöntemlerdir. Bu bağlamda; tez kapsamında potansiyel probiyotik mikroorganizma oldukları düşünülen SS9, SS20, SS30 ve SS33 kodlu dört izolat, tezin son aşamasında tür bazında identifiye edilmişlerdir. İdentifikasyon sonucunda; SS9 kodlu izolatin %99 oranında *Pediococcus pentosaceus*' a, SS20 kodlu izolatin *Pediococcus acidilactici*' ye, SS30 ve SS33 kodlu izolatin *Enterococcus durans*' a, benzediği gözlenmiştir. Konuyla ilgili literatür verileri incelendiğinde; *Pediococcus pentosaceus* türünün probiyotik özelliklerinin ve proteomik analizinin araştırıldığı bir çalışmada; bahsedilen türün, Gram negatif ve Gram pozitif çeşitli gıda patojenlerine karşı antagonistik aktivite gösterdiği, pH 2 gibi asidik ortamlarda %87 oranında, %0,5 w/v' lik safra tuzu içeren ortamda %99 oranında hayatta kaldığı, hidrofobik bağlanmaya karşı yüksek dirençli olduğu, penisilin, amoksisilin ve kloramfenikol gibi antibiyotiklere karşı da duyarlı

oldukları gözlenmiştir (Escobar-Sánchez *et al.* 2022). Bir başka çalışmada; *Pediococcus pentosaceus* suşlarının soya sütü için probiyotik yardımcı kültür olarak kullanılabilmesi değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *Pediococcus pentosaceus* suşlarının simüle edilmiş mide ortamlarında ve safra tuzu içerikli ortamlarda %90 oranında hayatta kaldıkları ve çok güçlü gıda patojenlerine karşı inhibe edici etki gösterdikleri gözlemlenmiştir. Bu açıdan da bahsedilen suşların potansiyel probiyotik organizma oldukları düşünülmüştür (Hu *et al.* 2021). Yapmış olduğumuz tez çalışmasında da elde ettiğimiz *Pediococcus* cinsine ait türlerin probiyotik olma potansiyeli araştırılmış ve literatür verileriyle karşılaştırıldığında elde edilen verilerin belirtilen türlerin probiyotik olarak kullanılabilmesini desteklediği görülmüştür. Özellikle SS9 kodlu *Pediococcus pentosaceus* türü ve SS20 kodlu *Pediococcus acidilactici* türünün tüm parametlerdeki olumlu sonuçları, bu izolatların gıda endüstrisinde probiyotik mikroorganizma olarak kullanılabilme potansiyelini ve GRAS statüsüne girebileceğini kanıtlamıştır. Bunların yanısıra hemen hemen tüm parametleri olumlu sonuç alınan, SS30 ve SS33 kodlu *Enterococcus durans* türlerine ait veriler de literatürle karşılaştırıldığında bu izolatların da özellikle gıdalara uygulanabilirlik konusunda oldukça önemli mikroorganizmalar olduğu gözlemlenmiştir. Bu bağlamda literatürde konu ile ilgili çalışmalar araştırıldığında; peynirden izole edilen potansiyel bir probiyotik suş olan *Enterococcus durans*' ın genomik analizinin tespit edildiği bir çalışmada; belirtilen türün agregasyon yeteneğinin yüksek olduğu, düşük pH' da gösterdikleri canlılık yüzdesinin yüksek olduğu, safra tuzu direncinin olduğu, antimikrobiyal aktivite gösterdiği görülmüştür (Comerlato *et al.* 2022). Yine Türkiye'de geleneksel peynirlerden izole edilen *Enterococcus* suşlarının güvenlik durumlarının ve probiyotik özelliklerinin belirlenmesinin araştırıldığı bir çalışmada elde edilen veriler; *Enterococcus* suşlarının gıdalarda uygulanabilirliklerinin mümkün olabileceğini, GRAS statüsüne girebilecek mikroorganizmalar olduklarını ve özellikle starter kültür olarak kullanılabileceklerini, bu bağlam da güçlü probiyotik suşlar olabileceğini göstermiştir. Tez çalışmamızda elde ettiğimiz *Enterococcus* suşlarının da elde edilen veriler incelendiğinde; hem gıda güvenliği açısından GRAS mikroorganizmalar olabileceği, hem de starter kültür olarak gıda uygulamalarında kendine önemli bir yer bulacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak; bir mikroorganizmanın probiyotik olarak gıdalarda kullanılabilmesi için; insan orijinli olması, patojen olmaması, mide asidine ve safra tuzuna dayanıklı olması, gastrointestinal sistemde canlılığını kaybetmemesi, antimikrobiyal karakterde bileşikler üretebilmesi, antibiyotik direncinin olmaması, bağışıklık sistemini uyarması, metabolik etkiler gösterebilmesi (kolesterol asimilasyonu, laktaz aktivitesi, vitamin üretimi) ve teknolojik süreçlere dayanıklı olması beklenmektedir (Mbye *et al.* 2020; Deng *et al.* 2021). Bu aşamaya kadar elde edilen tüm sonuçlar incelendiğinde; tüm parametrelerde ortak olarak SS9, SS20,

SS30 ve SS33 kodlu 4 adet izolatın hemolitik aktiviteye sahip olmadıkları, gastrointesinal koşullara direnç gösterdikleri, B12 vitamini üretebildikleri, β -galaktosidaz (laktaz) enzim aktivitesine sahip oldukları, kolesterol düşürücü etkilerinin olduğu, LA' yı KLA' ya dönüştürebildikleri kanıtlanmıştır. Bu sonuçlardan yola çıkılarak belirtilen izolatların probiyotik mikroorganizma olabilmeleri için güvenli suşlar olarak kabul edilmeleri gerekmektedir. Bu bağlamda GRAS statüsüne girebilmeleri açısından son aşamada antimikrobiyal potansiyelleri, patojen olmadıklarına dair virülans faktörleri, gıdalarda güvenli olarak kullanılabilmeleri potansiyelleri araştırılmıştır. Literatür verileriyle de uyumlu olarak; bu izolatların, [*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Gram +), *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (Gram +), *Bacillus cereus* ATCC 11778 (Gram +), *Salmonella typhi* ATCC 13076 (Gram -), *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram -), *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715 (Gram -)] gibi gıda patojenlerine karşı antagonistik etki gösterdikleri (Cizeikiene and Jagelaviciute 2021; Stivala *et al.* 2021), virülans özelliği kodlayan *asa1*, *cylA*, *esp*, *gele* ve *hyl* genlerini barındırmadıkları (Tatsing Foka and Ateba 2019) gözlenmiştir. Elde edilen tüm sonuçlar; belirtilen 4 izolatın (SS9, SS20, SS30 ve SS33) gıdalarda kullanılmak üzere potansiyel probiyotik bakteriler olduğunu, güvenli suşlar olarak GRAS statüsüne girebileceklerini ve metabolik özellikleri sebebiyle insan sağlığına yararlı suşlar olabileceğini ortaya koymuştur.

Sonuç ve Öneriler

1. Laktik asit bakterisi (LAB) olabileceği düşüncesi ile sucuk ve peynir örneklerinden toplamda 86 adet izolat elde edildi. Konvensiyonel analizleri yapılan 86 adet izolattan 80 adet izolatın potansiyel LAB olabileceği düşünülerek analizler bu izolatlar üzerinden gerçekleştirildi.
2. Hemolitik aktiviteleri değerlendirilen izolatların güvenli suşlar olarak kabul edilebilmeleri için γ -hemolitik sonuç veren 75 adet izolat seçildi. Kalan 5 adet izolatın ise hidrolize sebep olduğu gözlemlendi ve bu izolatlar β -hemolitik olarak değerlendirildi.
3. pH 1, 2, 3 gibi düşük pH değerlerinde canlılıklarını sürdüren suşların belirlenmesi amacıyla yapılan analiz sonucunda; 20 adet izolatın düşük pH larda yaşayabildiği gözlemlendi.
4. Probiyotik potansiyelli bakteri olabilmesi için önemli bir çıkış noktası olan, gastrointesinal koşullarda canlılıklarını sürdürebilme potansiyeline sahip olması gereken izolatların, bu koşullarda hayatta kalma oranları yüzde olarak belirlendi ve 10 adet izolatın pepsin, pankreatin ve safra tuzlarına dirençli suşlar olduğu kanıtlandı.

5. Düşük pH' lı ortamlarda ve gastrointestinal koşullarda canlı kalabilen suşların B12 vitamini üretim potansiyelleri HPLC ile "mg/L" cinsinden belirlendi. 15 adet suşun B12 vitamini üreticisi olduğu belirlendi.
6. β - Galaktozidaz enzim aktivitesine sahip bakterilerin bu potansiyeli; hem U/mL cinsinden hem de API ZYM sistem ile belirlendi. 7 adet izolatin β - Galaktozidaz enzim aktivitesine sahip olduğu gözlemlendi.
7. β - Galaktozidaz enzim aktivitesine sahip 7 adet izolatin kolesterol düşürücü etkisi araştırıldı. Hem yüzde olarak hem de kolesterolü parçaladığı bilinen kolesterol oksidaz (CHO) genini barındırıp barındırmadıkları araştırılan izolatlardan sadece 4 (SS9, SS20, SS30 ve SS33) tanesinin kolesterolü düşürme potansiyelinin oldukça yüksek olduğu gözlemlenmiştir.
8. Kolesterolü düşürdüğü kanıtlanan 4 adet izolatin linoleik asit üretiminden sorumlu LA1 genini taşıyıp taşımadıkları spesifik PCR ile araştırıldı ve SS9 kodlu izolatin güçlü, SS20 kodlu izolatin ise zayıf linoleik asit üreticisi olduğu gözlemlendi.
9. Antimikrobiyal potansiyeli araştırılan izolatlardan 4 adet izolatin da gıda patojenlerine karşı güçlü antagonistik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.
10. Tüm parametler sonucunda istenilen özelliklere sahip olan ve yüksek oranda potansiyel probiyotik organizma olabileceği düşünülen 4 adet izolatin (SS9, SS20, SS30 ve SS33) son aşamada patojenitelerini belirlemek amacıyla spesifik PCR ile virülans potansiyellerine bakıldı. 4 adet izolattan hiçbirinin virülans genleri taşımadığı ve böylece probiyotik bakteri olarak kullanılabilecek, patojen olmayan güvenli suşlar olabileceği düşünülmektedir.
11. Tez kapsamında belirtilen tüm parametrelerden pozitif sonuç alınan izolatların probiyotik olarak kullanım potansiyellerinin kanıtlanabilmesi için farklı parametlerin de eklendiği daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.
12. Araştırma sonuçlarına göre; elde edilen dört mikroorganizmanın potansiyel probiyotik olduğu ve bunların gıda endüstrisi alanında kullanılabileceği düşünülmektedir. Ayrıca yapılması planlanan ilave çalışmalarla, bu dört izolatin gıda endüstrisinde kullanılabilirlikleri tescil edilecek ve patent aşamasına ulaşılması mümkün olabilecektir.

KAYNAKÇA

- Abid, Y., Casillo, A., Gharsallah, H., Joulak, I., Lanzetta, R., Corsaro, M. M., Attia, H., & Azabou, S. (2018). Production and structural characterization of exopolysaccharides from newly isolated probiotic lactic acid bacteria. *International journal of biological macromolecules*, 108, 719–728. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.155>
- Abouloifa, H., Rokni, Y., Bellaouchi, R., Ghabbour, N., Karboune, S., Brasca, M., Ben Salah, R., Chihib, N. E., Saalaoui, E., & Asehrou, A. (2020). Characterization of Probiotic Properties of Antifungal *Lactobacillus* Strains Isolated from Traditional Fermenting Green Olives. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 12(2), 683–696. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09543-8>
- Adıgüzel, A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Adıgüzel, G., Fermente Türk Sucuğundan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Fenotipik Ve Genotipik Yöntemlerle Karakterizasyonu. 2008.
- Ahire, J. J., Jakkamsetty, C., Kashikar, M. S., Lakshmi, S. G., & Madempudi, R. S. (2021). *In vitro* Evaluation of Probiotic Properties of *Lactobacillus plantarum* UBLP40 Isolated from Traditional Indigenous Fermented Food. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 13(5), 1413–1424. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09775-7>
- Ait Chait, Y., Gunenc, A., Hosseinian, F., & Bendali, F. (2021). Antipathogenic and probiotic potential of *Lactobacillus brevis* strains newly isolated from Algerian artisanal cheeses. *Folia microbiologica*, 66(3), 429–440. <https://doi.org/10.1007/s12223-021-00857-1>
- Akova, B., Kıvanç, S. A., & Kıvanç, M. (2021). Antibiofilm effect of probiotic lactic acid bacteria against *Bacillus* spp obtained from the ocular surface. *European review for medical and pharmacological sciences*, 25(24), 7799–7805. https://doi.org/10.26355/eurev_202112_27626
- Albano, C., Morandi, S., Silvetti, T., Casiraghi, M. C., Manini, F., & Brasca, M. (2018). Lactic acid bacteria with cholesterol-lowering properties for dairy applications: *In vitro* and in situ activity. *Journal of dairy science*, 101(12), 10807–10818. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15096>
- Ale, E. C., Rojas, M. F., Reinheimer, J. A., & Binetti, A. G. (2020). *Lactobacillus fermentum*: Could EPS production ability be responsible for functional properties. *Food microbiology*, 90, 103465. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103465>
- AlKalbani, N. S., Turner, M. S., & Ayyash, M. M. (2019). Isolation, identification, and potential probiotic characterization of isolated lactic acid bacteria and *in vitro* investigation of the cytotoxicity, antioxidant, and antidiabetic activities in fermented sausage. *Microbial cell factories*, 18(1), 188. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1239-1>
- Angelin, J., & Kavitha, M. (2020). Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *International journal of biological macromolecules*, 162, 853–865. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.190>
- Anjana, & Tiwari, S. K. (2022). Bacteriocin-Producing Probiotic Lactic Acid Bacteria in Controlling Dysbiosis of the Gut Microbiota. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 851140. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.851140>

- Archer, A. C., Kurrey, N. K., & Halami, P. M. (2018). *In vitro* adhesion and anti-inflammatory properties of native *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus delbrueckii* spp. *Journal of applied microbiology*, 125(1), 243–256. <https://doi.org/10.1111/jam.13757>
- Attri, P., Jodha, D., Singh, J., & Dhanda, S. (2018). Purification, kinetic and functional characterization of membrane bound dipeptidyl peptidase-III from NCDC 252: a probiotic lactic acid bacteria. *Molecular biology reports*, 45(5), 973–986. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4245-1>
- Ayyash, M., Abu-Jdayil, B., Itsaranuwat, P., Galiwango, E., Tamiello-Rosa, C., Abdullah, H., Esposito, G., Hunashal, Y., Obaid, R. S., & Hamed, F. (2020). Characterization, bioactivities, and rheological properties of exopolysaccharide produced by novel probiotic *Lactobacillus plantarum* C70 isolated from camel milk. *International journal of biological macromolecules*, 144, 938–946. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.171>
- Bah, A., Albano, H., Barbosa, J. B., Fhoula, I., Gharbi, Y., Najjari, A., Boudabous, A., Teixeira, P., & Ouzari, H. I. (2019). Inhibitory Effect of *Lactobacillus plantarum* FL75 and *Leuconostoc mesenteroides* FL14 against Foodborne Pathogens in Artificially Contaminated Fermented Tomato Juices. *BioMed research international*, 2019, 6937837. <https://doi.org/10.1155/2019/6937837>
- Balabekyan, T. R., Karapetyan, K. J., Khachatryan, T. V., Khachatryan, G. E., & Tatikyan, S. S. (2018). Antimicrobial activity of preparations after combined cultivation of lactic acid bacteria and yeast strains. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 102(4), 933–938. <https://doi.org/10.1111/jpn.12891>
- Bamgbose, T., Alberdi, P., Abdullahi, I. O., Inabo, H. I., Bello, M., Sinha, S., Anvikar, A. R., Mateos-Hernandez, L., Torres-Maravilla, E., Bermúdez-Humarán, L. G., Cabezas-Cruz, A., & de la Fuente, J. (2022). Functional characterization of α -Gal producing lactic acid bacteria with potential probiotic properties. *Scientific reports*, 12(1), 7484. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11632-8>
- Bansal, P., Kumar, R., Singh, J., & Dhanda, S. (2019). Next generation sequencing, biochemical characterization, metabolic pathway analysis of novel probiotic *Pediococcus acidilactici* NCDC 252 and it's evolutionary relationship with other lactic acid bacteria. *Molecular biology reports*, 46(6), 5883–5895. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05022-z>
- Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Falah, F. (2021). Safety, probiotic properties, antimicrobial activity, and technological performance of *Lactobacillus* strains isolated from Iranian raw milk cheeses. *Food science & nutrition*, 9(8), 4094–4107. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2365>
- Behera, S. S., Ray, R. C., & Zdoiec, N. (2018). *Lactobacillus plantarum* with Functional Properties: An Approach to Increase Safety and Shelf-Life of Fermented Foods. *BioMed research international*, 2018, 9361614. <https://doi.org/10.1155/2018/9361614>
- Bengoa, A. A., Llamas, M. G., Iraporda, C., Dueñas, M. T., Abraham, A. G., & Garrote, G. L. (2018). Impact of growth temperature on exopolysaccharide production and probiotic properties of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir grains. *Food microbiology*, 69, 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.012>
- Benítez-Cabello, A., Torres-Maravilla, E., Bermúdez-Humarán, L., Langella, P., Martín, R., Jiménez-Díaz, R., & Arroyo-López, F. N. (2020). Probiotic Properties of *Lactobacillus* Strains Isolated from Table Olive Biofilms. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 12(3), 1071–1082. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09604-y>

- Bielik, B., Molnár, L., Vrabec, V., Andrášiová, R., Maruščáková, I. C., Nemcová, R., Toporčák, J., & Mudroňová, D. (2021). Biofilm-forming lactic acid bacteria of honey bee origin intended for potential probiotic use. *Acta veterinaria Hungarica*, 68(4), 345–353. <https://doi.org/10.1556/004.2020.00057>
- Bindu, A., & Lakshmi Devi, N. (2021). Identification and *in vitro* evaluation of probiotic attributes of lactic acid bacteria isolated from fermented food sources. *Archives of microbiology*, 203(2), 579–595. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02037-0>
- Breyer, G. M., Arechavaleta, N. N., Siqueira, F. M., & de Souza da Motta, A. (2021). Characterization of Lactic Acid Bacteria in Raw Buffalo Milk: a Screening for Novel Probiotic Candidates and Their Transcriptional Response to Acid Stress. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 13(2), 468–483. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09700-4>
- C, H. C., & T R, K. (2018). Probiotic potency of *Lactobacillus plantarum* KX519413 and KX519414 isolated from honey bee gut. *FEMS microbiology letters*, 365(4), 10.1093/femsle/fnx285. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx285>
- Cao, Z., Pan, H., Li, S., Shi, C., Wang, S., Wang, F., Ye, P., Jia, J., Ge, C., Lin, Q., & Zhao, Z. (2019). *In vitro* Evaluation of Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Yunnan De'ang Pickled Tea. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11(1), 103–112. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9395-x>
- Comerlato, C. B., Prichula, J., Siqueira, F. M., Ritter, A. C., Varela, A. P. M., Mayer, F. Q., & Brandelli, A. (2022). Genomic analysis of *Enterococcus durans* LAB18S, a potential probiotic strain isolated from cheese. *Genetics and molecular biology*, 45(1), e20210201. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2021-0201>
- Castilho, A., Colombo, M., Oliveira, L. L., Todorov, S. D. and Nero, L. A., 2019. *Lactobacillus curvatus* UFV-NPAC1 and other lactic acid bacteria isolated from calabresa, a fermented meat product, present high bacteriocinogenic activity against *Listeria monocytogenes*. *BMC Microbiology*. 19:63
- Chen, T., Wang, L., Li, Q., Long, Y., Lin, Y., Yin, J., Zeng, Y., Huang, L., Yao, T., Abbasi, M. N., Yang, H., Wang, Q., Tang, C., Khan, T. A., Liu, Q., Yin, J., Tu, Q., & Yin, Y. (2020). Functional probiotics of lactic acid bacteria from Hu sheep milk. *BMC microbiology*, 20(1), 228. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01920-6>
- Cheon, M. J., Lim, S. M., Lee, N. K., & Paik, H. D. (2020). Probiotic Properties and Neuroprotective Effects of *Lactobacillus buchneri* KU200793 Isolated from Korean Fermented Foods. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1227. <https://doi.org/10.3390/ijms21041227>
- Cizeikiene, D., & Jagelaviciute, J. (2021). Investigation of Antibacterial Activity and Probiotic Properties of Strains Belonging to *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Genera for Their Potential Application in Functional Food and Feed Products. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 13(5), 1387–1403. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09777-5>
- Coman, M. M., Verdenelli, M. C., Cecchini, C., Belà, B., Gramenzi, A., Orpianesi, C., Cresci, A., & Silvi, S. (2019). Probiotic characterization of *Lactobacillus* isolates from canine faeces. *Journal of applied microbiology*, 126(4), 1245–1256. <https://doi.org/10.1111/jam.14197>
- De Boeck, I., Spacova, I., Vanderveken, O. M., & Lebeer, S. (2021). Lactic acid bacteria as probiotics for the nose. *Microbial biotechnology*, 14(3), 859–869. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13759>
- de Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Magalhães Júnior, A. I., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2018). How to select a probiotic. A review and update of methods and

- de Souza, B. M. S., Borgonovi, T. F., Casarotti, S. N., Todorov, S. D., & Penna, A. L. B. (2019). *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus fermentum* Strains Isolated from Mozzarella Cheese: Probiotic Potential, Safety, Acidifying Kinetic Parameters and Viability under Gastrointestinal Tract Conditions. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11(2), 382–396. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9406-y>
- Dec, M., Nowaczek, A., Urban-Chmiel, R., Stępień-Pyśniak, D., & Wernicki, A. (2018). Probiotic potential of *Lactobacillus* isolates of chicken origin with anti-Campylobacter activity. *The Journal of veterinary medical science*, 80(8), 1195–1203. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0092>
- Deng, Z., Hou, K., Zhao, J., & Wang, H. (2021). The Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria and Their Applications in Animal Husbandry. *Current microbiology*, 79(1), 22. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02722-3>
- Diez-Echave, P., Martín-Cabrejas, I., Garrido-Mesa, J., Langa, S., Vezza, T., Landete, J. M., Hidalgo-García, L., Algieri, F., Mayer, M. J., Narbad, A., García-Lafuente, A., Medina, M., Rodríguez-Nogales, A., Rodríguez-Cabezas, M. E., Gálvez, J., & Arqués, J. L. (2021). Probiotic and Functional Properties of *Limosilactobacillus reuteri* INIA P572. *Nutrients*, 13(6), 1860. <https://doi.org/10.3390/nu13061860>
- Dlamini, Z. C., Langa, R. L. S., Aiyegoro, O. A., & Okoh, A. I. (2019). Safety Evaluation and Colonisation Abilities of Four Lactic Acid Bacteria as Future Probiotics. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11(2), 397–402. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9430-y>
- Domingos-Lopes, M. F. P., Stanton, C., Ross, R. P., & Silva, C. C. G. (2020). Histamine and cholesterol lowering abilities of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Journal of applied microbiology*, 129(6), 1428–1440. <https://doi.org/10.1111/jam.14733>
- Dos Santos Leandro, E., Ginani, V. C., de Alencar, E. R., Pereira, O. G., Rose, E. C. P., do Vale, H. M. M., Pratesi, R., Hecht, M. M., Cavalcanti, M. H., & Tavares, C. S. O. (2021). Isolation, Identification, and Screening of Lactic Acid Bacteria with Probiotic Potential in Silage of Different Species of Forage Plants, Cocoa Beans, and Artisanal Salami. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 13(1), 173–186. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09679-y>
- Dowarah, R., Verma, A. K., Agarwal, N., Singh, P., & Singh, B. R. (2018). Selection and characterization of probiotic lactic acid bacteria and its impact on growth, nutrient digestibility, health and antioxidant status in weaned piglets. *PloS one*, 13(3), e0192978. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192978>
- Ebrahimi, M., Sadeghi, A., Rahimi, D., Purabdollah, H., & Shahryari, S. (2021). Postbiotic and Anti-aflatoxigenic Capabilities of *Lactobacillus kunkeei* as the Potential Probiotic LAB Isolated from the Natural Honey. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 13(2), 343–355. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09697-w>
- Elzeini, H. M., Ali, A. R. A. A., Nasr, N. F., Hassan, M., Hassan, A. A. M., & Elenany, Y. E. (2021). Probiotic capability of novel lactic acid bacteria isolated from worker honey bees gut microbiota. *FEMS microbiology letters*, 368(6), fnab030. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnab030>
- Er, S., İstanbullu Tosun, A., Arık, G., & Kıvanç, M. (2019). Anticandidal activities of lactic acid bacteria isolated from the vagina. *Turkish journal of medical sciences*, 49(1), 375–383. <https://doi.org/10.3906/sag-1709-143>

- Escobar-Sánchez, M., Carrasco-Navarro, U., Juárez-Castelán, C., Lozano-Aguirre Beltrán, L., Pérez-Chabela, M. L., & Ponce-Alquicira, E. (2022). Probiotic Properties and Proteomic Analysis of *Pediococcus pentosaceus* 1101. *Foods* (Basel, Switzerland), 12(1), 46. <https://doi.org/10.3390/foods12010046>
- Fang, F., Xu, J., Li, Q., Xia, X., & Du, G. (2018). Characterization of a *Lactobacillus brevis* strain with potential oral probiotic properties. *BMC microbiology*, 18(1), 221. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1369-3>
- Fekri, A., Torbati, M., Yari Khosrowshahi, A., Bagherpour Shamloo, H., & Azadmard-Damirchi, S. (2020). Functional effects of phytate-degrading, probiotic lactic acid bacteria and yeast strains isolated from Iranian traditional sourdough on the technological and nutritional properties of whole wheat bread. *Food chemistry*, 306, 125620. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125620>
- Feng, T., & Wang, J. (2020). Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review. *Gut microbes*, 12(1), 1801944. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1801944>
- Garbacz K. (2022). Anticancer activity of lactic acid bacteria. *Seminars in cancer biology*, 86(Pt 3), 356–366. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.12.013>
- Góral, M., Kozłowicz, K., Pankiewicz, U., & Góral, D. (2018). Magnesium enriched lactic acid bacteria as a carrier for probiotic ice cream production. *Food chemistry*, 239, 1151–1159. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.053>
- Govindaraj, K., Samayanpaulraj, V., Narayanadoss, V., & Uthandakalaipandian, R. (2021). Isolation of Lactic Acid Bacteria from Intestine of Freshwater Fishes and Elucidation of Probiotic Potential for Aquaculture Application. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 13(6), 1598–1610. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09811-6>
- Grujović, M. Ž., Mladenović, K. G., Nikodijević, D. D., & Čomić, L. R. (2019). Autochthonous lactic acid bacteria-presentation of potential probiotics application. *Biotechnology letters*, 41(11), 1319–1331. <https://doi.org/10.1007/s10529-019-02729-8>
- Gupta, M., & Bajaj, B. K. (2018). Functional Characterization of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Kalarei and Development of Probiotic Fermented Oat Flour. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 10(4), 654–661. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9306-6>
- Güney, D., & Güngörmüşler, M. (2021). Development and Comparative Evaluation of a Novel Fermented Juice Mixture with Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 13(2), 495–505. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09710-2>
- Hajfarajollah, H., Eslami, P., Mokhtarani, B., & Akbari Noghabi, K. (2018). Biosurfactants from probiotic bacteria: A review. *Biotechnology and applied biochemistry*, 65(6), 768–783. <https://doi.org/10.1002/bab.1686>
- Hasan, M. S., Islam, M. Z., Liza, R. I., Sarker, M. A. H., Islam, M. A., & Harun-Ur-Rashid, M. (2022). Novel Probiotic Lactic Acid Bacteria with *In vitro* Bioremediation Potential of Toxic Lead and Cadmium. *Current microbiology*, 79(12), 387. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-03059-1>
- Hassan, M. U., Nayab, H., Shafique, F., Williamson, M. P., Almansouri, T. S., Asim, N., Shafi, N., Attacha, S., Khalid, M., Ali, N., & Akbar, N. (2020). Probiotic Properties of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus plantarum* Isolated from Traditional Pakistani Yoghurt. *BioMed research international*, 2020, 8889198. <https://doi.org/10.1155/2020/8889198>

- Hatti-Kaul, R., Chen, L., Dishisha, T., & Enshasy, H. E. (2018). Lactic acid bacteria: from starter cultures to producers of chemicals. *FEMS microbiology letters*, 365(20), 10.1093/femsle/fny213. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny213>
- Hatti-Kaul, R., Chen, L., Dishisha, T., & Enshasy, H. E. (2018). Lactic acid bacteria: from starter cultures to producers of chemicals. *FEMS microbiology letters*, 365(20), 10.1093/femsle/fny213. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny213>
- Hossain, M. I., Kim, K., Rahaman Mizan, M. F., Toughik, S. H., Ashrafudoulla, M., Roy, P. K., Nahar, S., Jahid, I. K., Choi, C., Park, S. H., & Ha, S. D. (2021). Comprehensive molecular, probiotic, and quorum-sensing characterization of anti-listerial lactic acid bacteria, and application as bioprotective in a food (milk) model. *Journal of dairy science*, 104(6), 6516–6534. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19034>
- Hu, D., Wu, J., Jin, L., Yuan, L., Li, J., Chen, X., & Yao, J. (2021). Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* strains as probiotic adjunct cultures for soybean milk post-fermentation. *Food research international* (Ottawa, Ont.), 148, 110570. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110570>
- Hussain, N., Tariq, M., Saris, P. E. J., & Zaidi, A. (2021). Evaluation of the probiotic and postbiotic potential of lactic acid bacteria from artisanal dairy products against pathogens. *Journal of infection in developing countries*, 15(1), 102–112. <https://doi.org/10.3855/jidc.13404>
- Hwanhlem, N., Salaipeth, L., Charoensook, R., Kanjan, P., & Maneerat, S. (2022). Lactic Acid Bacteria from Gamecock and Goat Originating from Phitsanulok, Thailand: Isolation, Identification, Technological Properties and Probiotic Potential. *Journal of microbiology and biotechnology*, 32(3), 355–364. <https://doi.org/10.4014/jmb.2110.10040>
- Jin, Y., Luo, B., Cai, J., Yang, B., Zhang, Y., Tian, F., & Ni, Y. (2021). Evaluation of indigenous lactic acid bacteria of raw mare milk from pastoral areas in Xinjiang, China, for potential use in probiotic fermented dairy products. *Journal of dairy science*, 104(5), 5166–5184. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19398>
- Joghataei, M., Shahidi, F., Pouladfar, G., Mortazavi, S. A., & Ghaderi, A. (2019). Probiotic potential comparison of *Lactobacillus* strains isolated from Iranian traditional food products and human feces with standard probiotic strains. *Journal of the science of food and agriculture*, 99(15), 6680–6688. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9945>
- Jomehzadeh, N., Javaherizadeh, H., Amin, M., Saki, M., Al-Ouqaili, M. T. S., Hamidi, H., Seyedmahmoudi, M., & Gorjian, Z. (2020). Isolation and identification of potential probiotic *Lactobacillus* species from feces of infants in southwest Iran. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 96, 524–530. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.05.034>
- Kaktcham, P. M., Temgoua, J. B., Zambou, F. N., Diaz-Ruiz, G., Wachter, C., & Pérez-Chabela, M. L. (2018). *In vitro* Evaluation of the Probiotic and Safety Properties of Bacteriocinogenic and Non-Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria from the Intestines of Nile Tilapia and Common Carp for Their Use as Probiotics in Aquaculture. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 10(1), 98–109. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9312-8>
- Kang, C. H., Gu, T., & So, J. S. (2018). Possible Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Oysters (*Crassostrea gigas*). *Probiotics and antimicrobial proteins*, 10(4), 728–739. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9315-5>
- Kıvanç, M ve Erikçi, Ş.Y. 2018. Sofralık Fermente Zeytinlerden (*Olea Europaea* L.) İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Ve Bazı Metabolik

- Kim, E., Chang, H. C., & Kim, H. Y. (2020). Complete Genome Sequence of *Lactobacillus plantarum* EM, A Putative Probiotic Strain with the Cholesterol-Lowering Effect and Antimicrobial Activity. *Current microbiology*, 77(8), 1871–1882. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02000-8>
- Kishino, S., Ogawa, J., Omura, Y. et al. Conjugated linoleic acid production from linoleic acid by lactic acid bacteria. *J Amer Oil Chem Soc* 79, 159–163 (2002). <https://doi.org/10.1007/s11746-002-0451-4>
- Kocabay, S., & Çetinkaya, S. (2020). Probiotic Properties of a *Lactobacillus fermentum* Isolated from New-born Faeces. *Journal of oleo science*, 69(12), 1579–1584. <https://doi.org/10.5650/jos.ess20224>
- Kouitchou Mabeku, L. B., Ngue, S., Bonsou Nguemo, I., & Leundji, H. (2020). Potential of selected lactic acid bacteria from Theobroma cacao fermented fruit juice and cell-free supernatants from cultures as inhibitors of *Helicobacter pylori* and as good probiotic. *BMC research notes*, 13(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-4923-7>
- Kunduhoglu, B., & Hacıoglu, S. (2021). Probiotic Potential and Gluten Hydrolysis Activity of *Lactobacillus brevis* KT16-2. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 13(3), 720–733. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09723-x>
- Laosee, W., Kantachote, D., Chansuwan, W., & Sirinupong, N. (2022). Effects of Probiotic Fermented Fruit Juice-Based Biotransformation by Lactic Acid Bacteria and *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 on Anti-Salmonella and Antioxidative Properties. *Journal of microbiology and biotechnology*, 32(10), 1315–1324. <https://doi.org/10.4014/jmb.2206.06012>
- Larsen, N., Cahú, T. B., Isay Saad, S. M., Blennow, A., & Jespersen, L. (2018). The effect of pectins on survival of probiotic *Lactobacillus* spp. in gastrointestinal juices is related to their structure and physical properties. *Food microbiology*, 74, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.015>
- Lemos Junior, W. J. F., Guerra, A. F., Tarrah, A., da Silva Duarte, V., Giacomini, A., Luchese, R. H., & Corich, V. (2020). Safety and Stability of Two Potentially Probiotic *Lactobacillus* Strains After *In vitro* Gastrointestinal Transit. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 12(2), 657–666. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09565-2>
- Lee, J., Jin, Y. H., Pawluk, A. M., & Mah, J. H. (2021). Reduction in Biogenic Amine Content in Baechu (Napa Cabbage) Kimchi by Biogenic Amine-Degrading Lactic Acid Bacteria. *Microorganisms*, 9(12), 2570. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122570>
- Li, B., & Lu, S. (2020). The importance of amine-degrading enzymes on the biogenic amine degradation in fermented foods: A review. *Process Biochemistry*, 99, 331–339.
- Li, Y., Liu, T., Zhao, M., Zhong, H., Luo, W., & Feng, F. (2019). *In vitro* and in vivo investigations of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Chinese traditional sourdough. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(4), 1893–1903. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9554-8>
- Liao, N., Pang, B., Jin, H., Xu, X., Yan, L., Li, H., Shao, D., & Shi, J. (2020). Potential of lactic acid bacteria derived polysaccharides for the delivery and controlled release of oral probiotics. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 323, 110–124. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.04.022>
- Lim, J. H., Yoon, S. M., Tan, P. L., Yang, S., Kim, S. H., & Park, H. J. (2018). Probiotic Properties of *Lactobacillus Plantarum* LRCC5193, a Plant-Origin Lactic Acid

- Bacterium Isolated from Kimchi and Its Use in Chocolates. *Journal of food science*, 83(11), 2802–2811. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14364>
- Lim, S. M., Lee, N. K., Kim, K. T., & Paik, H. D. (2020). Probiotic *Lactobacillus fermentum* KU200060 isolated from watery kimchi and its application in probiotic yogurt for oral health. *Microbial pathogenesis*, 147, 104430. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104430>
- Liu, Q., Ni, X., Wang, Q., Peng, Z., Niu, L., Xie, M., Lin, Y., Zhou, Y., Sun, H., Pan, K., Jing, B., & Zeng, D. (2019). Investigation of Lactic Acid Bacteria Isolated from Giant Panda Feces for Potential Probiotics In Vitro. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11(1), 85–91. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9381-8>
- Liu, W., Chen, M., Duo, L., Wang, J., Guo, S., Sun, H., Menghe, B., & Zhang, H. (2020). Characterization of potentially probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from human colostrum. *Journal of dairy science*, 103(5), 4013–4025. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17602>
- Łubiech, K., & Twarużek, M. (2020). *Lactobacillus* Bacteria in Breast Milk. *Nutrients*, 12(12), 3783. <https://doi.org/10.3390/nu12123783>
- Ma, C., Zhang, S., Lu, J., Zhang, C., Pang, X., & Lv, J. (2019). Screening for Cholesterol-Lowering Probiotics from Lactic Acid Bacteria Isolated from Corn Silage Based on Three Hypothesized Pathways. *International journal of molecular sciences*, 20(9), 2073. <https://doi.org/10.3390/ijms20092073>
- Mann, S., Park, M. S., Johnston, T. V., Ji, G. E., Hwang, K. T., & Ku, S. (2021). Isolation, Characterization and Biosafety Evaluation of *Lactobacillus Fermentum* OK with Potential Oral Probiotic Properties. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 13(5), 1363–1386. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09761-z>
- Mansilla, F. I., Ficoseco, C. A., Miranda, M. H., Puglisi, E., Nader-Macías, M. E. F., Vignolo, G. M., & Fontana, C. A. (2022). Administration of probiotic lactic acid bacteria to modulate fecal microbiome in feedlot cattle. *Scientific reports*, 12(1), 12957. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16786-z>
- Mantzourani, I., Chondrou, P., Bontsidis, C., Karolidou, K., Terpou, A., Alexopoulos, A., Bezirtzoglou, E., Galanis, A., & 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, 751–763.
- Marchwińska, K., & Gwiazdowska, D. (2021). Isolation and probiotic potential of lactic acid bacteria from swine feces for feed additive composition. *Archives of microbiology*, 204(1), 61. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02700-0>
- Margalho, L. P., Jorge, G. P., Noleto, D. A. P., Silva, C. E., Abreu, J. S., Piran, M. V. F., Brocchi, M., & Sant'Ana, A. S. (2021). Biopreservation and probiotic potential of a large set of lactic acid bacteria isolated from Brazilian artisanal cheeses: From screening to in product approach. *Microbiological research*, 242, 126622. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126622>
- Mays, Z. J., & Nair, N. U. (2018). Synthetic biology in probiotic lactic acid bacteria: At the frontier of living therapeutics. *Current opinion in biotechnology*, 53, 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.01.028>
- Mazlumi, A., Panahi, B., Hejazi, M. A., & Nami, Y. (2022). Probiotic potential characterization and clustering using unsupervised algorithms of lactic acid bacteria from saltwater fish samples. *Scientific reports*, 12(1), 11952. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16322-z>

- Mbye, M., Baig, M. A., AbuQamar, S. F., El-Tarabily, K. A., Obaid, R. S., Osaili, T. M., Al-Nabulsi, A. A., Turner, M. S., Shah, N. P., & Ayyash, M. M. (2020). Updates on understanding of probiotic lactic acid bacteria responses to environmental stresses and highlights on proteomic analyses. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 19(3), 1110–1124. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12554>
- Menezes, A. G. T., Ramos, C. L., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2018). Combination of probiotic yeast and lactic acid bacteria as starter culture to produce maize-based beverages. *Food research international* (Ottawa, Ont.), 111, 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.065>
- Minj, J., Chandra, P., Paul, C., & Sharma, R. K. (2021). Bio-functional properties of probiotic *Lactobacillus*: current applications and research perspectives. *Critical reviews in food science and nutrition*, 61(13), 2207–2224. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1774496>
- Mohd-Zubri, N. S., Ramasamy, K., & Abdul-Rahman, N. Z. (2022). Characterization and potential oral probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* FT 12 and *Lactobacillus brevis* FT 6 isolated from Malaysian fermented food. *Archives of oral biology*, 143, 105515. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2022.105515>
- Mojgani, N., Shahali, Y., & Dadar, M. (2020). Immune modulatory capacity of probiotic lactic acid bacteria and applications in vaccine development. *Beneficial microbes*, 11(3), 213–226. <https://doi.org/10.3920/BM2019.0121>
- Molae Parvarei, M., Fazeli, M. R., Mortazavian, A. M., Sarem Nezhad, S., Mortazavi, S. A., Golabchifar, A. A., & Khorshidian, N. (2021). Comparative effects of probiotic and paraprobiotic addition on microbiological, biochemical and physical properties of yogurt. *Food research international* (Ottawa, Ont.), 140, 110030. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110030>
- Monteiro, C. R. A. V., do Carmo, M. S., Melo, B. O., Alves, M. S., Dos Santos, C. I., Monteiro, S. G., Bomfim, M. R. Q., Fernandes, E. S., & Monteiro-Neto, V. (2019). *In vitro* Antimicrobial Activity and Probiotic Potential of Bifidobacterium and Lactobacillus against Species of Clostridium. *Nutrients*, 11(2), 448. <https://doi.org/10.3390/nu11020448>
- Moreno, I., Marasca, E. T. G., de Sá, P. B. Z. R., de Souza Moitinho, J., Marquezini, M. G., Alves, M. R. C., & Bromberg, R. (2018). Evaluation of Probiotic Potential of Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Meat Products. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 10(4), 762–774. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9388-9>
- Mosso, A. L., Jimenez, M. E., Vignolo, G., LeBlanc, J. G., & Samman, N. C. (2018). Increasing the folate content of tuber based foods using potentially probiotic lactic acid bacteria. *Food research international* (Ottawa, Ont.), 109, 168–174. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.073>
- Motey, G. A., Owusu-Kwarteng, J., Obiri-Danso, K., Ofori, L. A., Ellis, W. O., & Jespersen, L. (2021). *In vitro* properties of potential probiotic lactic acid bacteria originating from Ghanaian indigenous fermented milk products. *World journal of microbiology & biotechnology*, 37(3), 52. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03013-6>
- Olđak, A., Zielińska, D., Łepecka, A., Długosz, E., & Kołożyn-Krajewska, D. (2020). *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Polish Regional Cheeses Exhibit Anti-Staphylococcal Activity and Selected Probiotic Properties. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 12(3), 1025–1038. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09587-w>
- Papadopoulou, O. S., Argyri, A. A., Varzakis, E. E., Tassou, C. C., & Chorianopoulos, N. G. (2018). Greek functional Feta cheese: Enhancing quality and safety using a

- Lactobacillus plantarum* strain with probiotic potential. Food microbiology, 74, 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.005>
- Park, D. M., Bae, J. H., Kim, M. S., Kim, H., Kang, S. D., Shim, S., Lee, D., Seo, J. H., Kang, H., & Han, N. S. (2019). Suitability of *Lactobacillus plantarum* SPC-SNU 72-2 as a Probiotic Starter for Sourdough Fermentation. Journal of microbiology and biotechnology, 29(11), 1729–1738. <https://doi.org/10.4014/jmb.1907.07039>
- Pei, L., Yang, H., Qin, S., Yan, Z., Zhang, H., Lan, Y., Li, A., Iqbal, M., & Shen, Y. (2021). Isolation and Evaluation of Probiotic Potential of Lactic Acid Strains From Healthy Equines for Potential Use in Salmonella Infection. Journal of equine veterinary science, 96, 103312. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103312>
- Pérez, M. B., Argañaraz Martinez, E., Babot, J. D., Pérez Chaia, A., & Saguir, F. M. (2022). Growth studies of dominant lactic acid bacteria in orange juice and selection of strains to ferment citric fruit juices with probiotic potential. Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 53(4), 2145–2156. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00830-1>
- Perez, R. H., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2022). Multiple bacteriocin production in lactic acid bacteria. Journal of bioscience and bioengineering, 134(4), 277–287. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2022.07.007>
- Petrova, P., Arsov, A., Tsvetanova, F., Parvanova-Mancheva, T., Vasileva, E., Tsigoriyna, L., & Petrov, K. (2022). The Complex Role of Lactic Acid Bacteria in Food Detoxification. Nutrients, 14(10), 2038. <https://doi.org/10.3390/nu14102038>
- Piccioni, A., Franza, L., Vaccaro, V., Saviano, A., Zanza, C., Candelli, M., Covino, M., Franceschi, F., & Ojetti, V. (2021). Microbiota and Probiotics: The Role of *Limosilactobacillus Reuteri* in Diverticulitis. Medicina (Kaunas, Lithuania), 57(8), 802. <https://doi.org/10.3390/medicina57080802>
- Pradhan, P., & Tamang, J. P. (2021). Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally prepared dry starters of the Eastern Himalayas. World journal of microbiology & biotechnology, 37(1), 7. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02975-3>
- Prete, R., Long, S. L., Joyce, S. A., & Corsetti, A. (2020). Genotypic and phenotypic characterization of food-associated *Lactobacillus plantarum* isolates for potential probiotic activities. FEMS microbiology letters, 367(10), fnaa076. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa076>
- Pumriw, S., Luang-In, V., & Samappito, W. (2021). Screening of Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Pak-Sian for Use as a Starter Culture. Current microbiology, 78(7), 2695–2707. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02521-w>
- Rai, R., & Tamang, J. P. (2022). *In vitro* and genetic screening of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented cow-milk and yak-milk products of Sikkim, India. World journal of microbiology & biotechnology, 38(2), 25. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03215-y>
- Rajab, S., Tabandeh, F., Shahraky, M. K., & Alahyaribeik, S. (2020). The effect of lactobacillus cell size on its probiotic characteristics. Anaerobe, 62, 102103. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.102103>
- Raveschot, C., Coutte, F., Frémont, M., Vaeremans, M., Dugersuren, J., Demberel, S., Drider, D., Dhulster, P., Flahaut, C., & Cudennec, B. (2020). Probiotic *Lactobacillus* strains from Mongolia improve calcium transport and uptake by intestinal cells in vitro. Food research international (Ottawa, Ont.), 133, 109201. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109201>

- Reuben, R. C., Roy, P. C., Sarkar, S. L., Alam, R. U., & Jahid, I. K. (2019). Isolation, characterization, and assessment of lactic acid bacteria toward their selection as poultry probiotics. *BMC microbiology*, 19(1), 253. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1626-0>
- Reuben, R. C., Roy, P. C., Sarkar, S. L., Rubayet Ul Alam, A. S. M., & Jahid, I. K. (2020). Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties. *Journal of dairy science*, 103(2), 1223–1237. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17092>
- Ribeiroa, S.C., Stanton, C., Yang, B., Rossd, R. P. and Silvaa, C.C.G. 2018. Conjugated linoleic acid production and probiotic assessment of *Lactobacillus plantarum* isolated from Pico cheese. *LWT*. Pages 403-411.
- Ringø, E., Van Doan, H., Lee, S. H., Soltani, M., Hoseinifar, S. H., Harikrishnan, R., & Song, S. K. (2020). Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture. *Journal of applied microbiology*, 129(1), 116–136. <https://doi.org/10.1111/jam.14628>
- Rodrigues, N. P. A., Garcia, E. F., & de Souza, E. L. (2021). Selection of lactic acid bacteria with promising probiotic aptitudes from fruit and ability to survive in different food matrices. *Brazilian journal of microbiology* : [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 52(4), 2257–2269. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00543-x>
- Rodríguez Arreola, A., Solís Pacheco, J. R., Lacroix, M., Balcazar López, E., Navarro Hernández, R. E., Sandoval Garcia, F., Gutiérrez Padilla, J. A., García Morales, E., & Aguilar Uscanga, B. R. (2021). *In vivo* assessment and characterization of lactic acid bacteria with probiotic profile isolated from human milk powder. Evaluación y caracterización in vivo de bacterias acidolácticas con perfil probiótico aisladas a partir de leche materna en polvo. *Nutricion hospitalaria*, 38(1), 152–160. <https://doi.org/10.20960/nh.03335>
- Romero-Luna, H. E., Peredo-Lovillo, A., Hernández-Mendoza, A., Hernández-Sánchez, H., Cauch-Sánchez, P. I., Ribas-Aparicio, R. M., & Dávila-Ortiz, G. (2020). Probiotic Potential of *Lactobacillus paracasei* CT12 Isolated from Water Kefir Grains (Tibicos). *Current microbiology*, 77(10), 2584–2592. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02016-0>
- Ruggirello, M., Nucera, D., Cannoni, M., Peraino, A., Rosso, F., Fontana, M., Luca Cocolin, L. and Dolci, P. 2019. Antifungal activity of yeasts and lactic acid bacteria isolated from cocoa bean fermentations. *Food Research International*. Pages 519-525.
- Sharma, K., Attri, S., & Goel, G. (2019). Selection and Evaluation of Probiotic and Functional Characteristics of Autochthonous Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Wheat Flour Dough Babroo. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11(3), 774–784. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9466-z>
- Shazadi, K., & Arshad, N. (2022). Evaluation of inhibitory and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from vaginal microflora. *Folia microbiologica*, 67(3), 427–445. <https://doi.org/10.1007/s12223-021-00942-5>
- Shi, Y., Cui, X., Gu, S., Yan, X., Li, R., Xia, S., Chen, H., & Ge, J. (2019). Antioxidative and Probiotic Activities of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Artisanal Milk Cheese from Northeast China. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11(4), 1086–1099. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9452-5>
- Sirichokchatchawan, W., Pupa, P., Praechansri, P., Am-In, N., Tanasupawat, S., Sonthayanon, P., & Prapasarakul, N. (2018). Autochthonous lactic acid bacteria isolated from pig faeces in Thailand show probiotic properties and antibacterial activity against enteric

- pathogenic bacteria. *Microbial pathogenesis*, 119, 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.04.031>
- Sjofjan, O., Adli, D. N., Harahap, R. P., Jayanegara, A., Utama, D. T., & Seruni, A. P. (2021). The effects of lactic acid bacteria and yeasts as probiotics on the growth performance, relative organ weight, blood parameters, and immune responses of broiler: A meta-analysis. *F1000Research*, 10, 183. <https://doi.org/10.12688/f1000research.51219.3>
- Son, S. H., Yang, S. J., Jeon, H. L., Yu, H. S., Lee, N. K., Park, Y. S., & Paik, H. D. (2018). Antioxidant and immunostimulatory effect of potential probiotic *Lactobacillus paraplantarum* SC61 isolated from Korean traditional fermented food, jangajji. *Microbial pathogenesis*, 125, 486–492. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.10.018>
- Song, M. W., Jang, H. J., Kim, K. T., & Paik, H. D. (2019). Probiotic and Antioxidant Properties of Novel *Lactobacillus brevis* KCCM 12203P Isolated from Kimchi and Evaluation of Immune-Stimulating Activities of Its Heat-Killed Cells in RAW 264.7 Cells. *Journal of microbiology and biotechnology*, 29(12), 1894–1903. <https://doi.org/10.4014/jmb.1907.07081>
- Sornsenee, P., Singkhamanan, K., Sangkhathat, S., Saengsuwan, P., & Romyasamit, C. (2021). Probiotic Properties of *Lactobacillus* Species Isolated from Fermented Palm Sap in Thailand. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 13(4), 957–969. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09754-y>
- Steinberg, R. S., Silva, L. C. S. E., de Souza, M. R., Reis, R. B., Bicalho, A. F., Nunes, J. P. S., Dias, A. A. M., Nicoli, J. R., Neumann, E., & Nunes, Á. C. (2022). Prospecting of potentially probiotic lactic acid bacteria from bovine mammary ecosystem: imminent partners from bacteriotherapy against bovine mastitis. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 25(1), 189–206. <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00209-6>
- Steiner, N. C., & Lorentz, A. (2021). Probiotic Potential of *Lactobacillus* Species in Allergic Rhinitis. *International archives of allergy and immunology*, 182(9), 807–818. <https://doi.org/10.1159/000515352>
- Stivala, A., Carota, G., Fuochi, V., & Furneri, P. M. (2021). *Lactobacillus rhamnosus* AD3 as a Promising Alternative for Probiotic Products. *Biomolecules*, 11(1), 94. <https://doi.org/10.3390/biom11010094>
- Sugajski, M., Maślak, E., Złoch, M., Rafińska, K., Pomastowski, P., Białczak, D., & Buszewski, B. (2022). New sources of lactic acid bacteria with potential antibacterial properties. *Archives of microbiology*, 204(6), 349. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02956-0>
- Suissa, R., Oved, R., Jankelowitz, G., Turjeman, S., Koren, O., & Kolodkin-Gal, I. (2022). Molecular genetics for probiotic engineering: dissecting lactic acid bacteria. *Trends in microbiology*, 30(3), 293–306. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.07.007>
- Suyabatmaz, Ş., Karaoğlu, Ş. A., Bozdeveci, A., & Akpınar, R. (2022). Honeybee-associated lactic acid bacteria and their probiotic potential for human use. *World journal of microbiology & biotechnology*, 39(1), 2. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03427-w>
- Szutowska, J., & Gwiazdowska, D. (2021). Probiotic potential of lactic acid bacteria obtained from fermented curly kale juice. *Archives of microbiology*, 203(3), 975–988. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02095-4>
- Tang, W., Li, C., He, Z., Pan, F., Pan, S., & Wang, Y. (2018). Probiotic Properties and Cellular Antioxidant Activity of *Lactobacillus plantarum* MA2 Isolated from Tibetan Kefir

- Grains. Probiotics and antimicrobial proteins, 10(3), 523–533. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9349-8>
- Tatsing Foka, F. E., & Ateba, C. N. (2019). Detection of Virulence Genes in Multidrug Resistant *Enterococci* Isolated from Feedlots Dairy and Beef Cattle: Implications for Human Health and Food Safety. *BioMed research international*, 2019, 5921840. <https://doi.org/10.1155/2019/5921840>
- Terzić-Vidojević, A., Veljović, K., Tolinački, M., Živković, M., Lukić, J., Lozo, J., Fira, Đ., Jovčić, B., Strahinić, I., Begović, J., Popović, N., Miljković, M., Kojić, M., Topisirović, L., & Golić, N. (2020). Diversity of non-starter lactic acid bacteria in autochthonous dairy products from Western Balkan Countries - Technological and probiotic properties. *Food research international* (Ottawa, Ont.), 136, 109494. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109494>
- Torzewska, A., Wiewiura, P., Brodecka, D., Szczerbic, D., & Różalski, A. (2021). Potentially Probiotic *Lactobacillus* Strains Derived from Food Intensify Crystallization Caused by *Proteus mirabilis* in Urine. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 13(2), 441–452. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09689-w>
- Touret, T., Oliveira, M., & Semedo-Lemsaddek, T. (2018). Putative probiotic lactic acid bacteria isolated from sauerkraut fermentations. *PloS one*, 13(9), e0203501. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203501>
- Turgut, T., & Cakmakci, S. (2018). Probiotic Strawberry Yogurts: Microbiological, Chemical and Sensory Properties. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 10(1), 64–70. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9278-6>
- van Zyl, W. F., Deane, S. M., & Dicks, L. M. T. (2020). Molecular insights into probiotic mechanisms of action employed against intestinal pathogenic bacteria. *Gut microbes*, 12(1), 1831339. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1831339>
- Vasiee, A., Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, S. A., & Noorbakhsh, H. (2018). Diversity and Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Horreh, a Traditional Iranian Fermented Food. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 10(2), 258–268. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9282-x>
- Wang, A., Lin, J., & Zhong, Q. (2020). Probiotic powders prepared by mixing suspension of *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514 and spray-dried lactose: Physical and microbiological properties. *Food research international* (Ottawa, Ont.), 127, 108706. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108706>
- Wang, X., Wang, W., Lv, H., Zhang, H., Liu, Y., Zhang, M., Wang, Y., & Tan, Z. (2021). Probiotic Potential and Wide-spectrum Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Infant Feces. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 13(1), 90–101. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09658-3>
- Wei, X., Zhang, Y., Zhou, H., Tian, F., & Ni, Y. (2019). Antimicrobial activities and *in vitro* properties of cold-adapted *Lactobacillus* strains isolated from the intestinal tract of cold water fishes of high latitude water areas in Xinjiang, China. *BMC microbiology*, 19(1), 247. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1623-3>
- Yelnetty, A., Purwadi, & Ekawati Tallei, T. (2020). Indigenous Lactic Acid Bacteria Isolated from Spontaneously Fermented Goat Milk as Potential Probiotics. *Pakistan journal of biological sciences : PJBS*, 23(7), 883–890. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2020.883.890>
- Yusuf, D., Nuraida, L., Dewanti-Hariyadi, R., & Hunaefi, D. (2019). *In vitro* Characterization of Lactic Acid Bacteria from Indonesian Kefir Grains as Probiotics with Cholesterol-

- Lowering Effect. Journal of microbiology and biotechnology, 30(5), 726–732.
<https://doi.org/10.4014/jmb.1910.10028>
- Zhang, Q., Wang, M., Ma, X., Li, Z., Jiang, C., Pan, Y., & Zeng, Q. (2022). *In vitro* investigation on lactic acid bacteria isolated from Yak faeces for potential probiotics. Frontiers in cellular and infection microbiology, 12, 984537.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.984537>
- Zielińska, D., & Kolożyn-Krajewska, D. (2018). Food-Origin Lactic Acid Bacteria May Exhibit Probiotic Properties: Review. BioMed research international, 2018, 5063185.
<https://doi.org/10.1155/2018/5063185>
- Zoumpopoulou, G., Tzouvanou, A., Mavrogonatou, E., Alexandraki, V., Georgalaki, M., Anastasiou, R., Papadelli, M., Manolopoulou, E., Kazou, M., Kletsas, D., Papadimitriou, K., & Tsakalidou, E. (2018). Probiotic Features of Lactic Acid Bacteria Isolated from a Diverse Pool of Traditional Greek Dairy Products Regarding Specific Strain-Host Interactions. Probiotics and antimicrobial proteins, 10(2), 313–322.
<https://doi.org/10.1007/s12602-017-9311-9>
- Zoumpopoulou, G., Pot, B., Tsakalidou, E., Papadimitriou, K., 2017. Dairy probiotics: beyond the role of promoting gut and immune health. Int. Dairy J. 67, 46–60.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.09.010>

ÖZ GEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı:
Doğum tarihi:
Doğum Yeri:
Uyruğu:
E Mail:
Eğitim Bilgileri
Yabancı Dil Bilgisi
Tezden Üretilmiş Yayınlar