

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Derya UYANDIRAN

**BAZI GAMLARIN *Bacillus coagulans*'İN GELİŞİMİ VE
BİYOFİLM OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİ**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2020

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI GAMLARIN *Bacillus coagulans*'IN GELİŞİMİ VE BİYOFİLM OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİ

Derya UYANDIRAN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA

Yıl: 2020, Sayfa: 81

Jüri : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA

: Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ

: Doç. Dr. Emel ÜNAL TURHAN

Bu çalışmada prebiyotik özelliğini belirlemek amacıyla bazı gamların (keçiyoynuzu, pektin, ksantan ve aljinat) *B.coagulans*' in gelişimi ve biyofilm oluşturma özelliği üzerine etkisi araştırılmıştır.

Gamların, *B.coagulans*'in gelişimi üzerine etkisi, nutrient agar besiyeri kullanılarak, yayma ekim yöntemi ile belirlenmiştir. Farklı gamlar kullanarak *B.coagulans*' in biyofilm oluşturma özelliklerini belirlemek amacıyla ise, mikrotitrasyon plak yöntemi kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan *B. coagulans* biyofilmlerinin % 0.4 kristal viyole ilavesiyle 630 nm'de ölçülen absorbans değeri 0.11 bulunmuştur. Absorbans değerinin >0.1 olması biyofilm oluşumunu göstermektedir. Çeşitli gamların (keçiyoynuzu, pektin, ksantan, aljinat) prebiyotik *B. coagulans* biyofilmi üzerine etkilerinin belirlenmesine yönelik çalışmalardan elde edilen bulgular; % 0.4 kristal viyole ilavesiyle 630 nm'de ölçülen absorbans değeri % 2, 3, 4 oranlarında sırasıyla pektin gamı için 0.27, 0.33 ve 0.40, ksantan gamı için 0.44, 0.25 ve 0.46 keçi yoynuzu gamı için 1.68, 0.21 ve 0.91, aljinat gamı için 0.35, 0.32 ve 0.26 ölçülmüştür. Biyofilm denemeleri sonucunda keçiyoynuzu, ksantan, aljinat ve pektin gamlarının *B. coagulans*' in biyofilm oluşturma özelliğini artırdığını göstermiştir.

Araştırmada kullanılan prebiyotik *B. coagulans*' in başlangıç sayısı 7.69 log kob/mL iken, inkübasyon sonunda çeşitli gamların *B. coagulans*'in sayısını artırdığı belirlenmiştir. %2, %3 ve %4 pektin gamı ilavesi sonucunda *B. coagulans* canlı hücre sayısında sırasıyla 0.22, 1.02 ve 1.51 log kob/mL artış meydana gelmiştir. %2, %3 ve %4 ksantan gamı ilavesi sonucunda *B. coagulans*'in canlı hücre sayısında 0.27 log kob/mL düşüş, 0.51 log kob/mL artış ve 2.26 log kob/mL artış meydana gelmiştir. Aynı oranlarda (%2, 3 ve 4) keçi yoynuzu ilavesi sonucunda ise *B. coagulans*'in canlı hücre sayısında sırasıyla 0.35 log kob/mL, 1.06 log kob/mL ve 1.18 log kob/mL artış meydana gelmiştir. % 2, 3, 4 aljinat gamı ilavesi sonucunda ise *B. coagulans*'in canlı hücre sayısında sırasıyla 0.41, 1.5 ve 1.78 log kob/mL artış meydana gelmiştir. Bu artış, tüm kullanılan gamların *B. coagulans* bakteri gelişimi üzerine olumlu etkisi olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *B. coagulans*, biyofilm, prebiyotik, gam

ABSTRACT

MSc THESIS

THE EFFECTS OF SOME GUMS ON THE DEVELOPMENT OF *Bacillus coagulans* AND BIOFILM FORMATION

Derya UYANDIRAN

CUKUROVA UNIVERSTY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
Year: 2020 Page:81
Jury : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
: Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
: Assoc. Prof. Dr. Emel ÜNAL TURHAN

In this study, the effects of some gums (locus, pectin, xanthan and aljinate) which have prebiotic features on growth rate of *B.Coagulans* and biofilm is examined.

While Microtiter plate method was used for biofilm formation, nutrient agar spreading method was used for observing growth rate of *B. Coagulans*. The absorbance value of biofilms of *B. Coagulans* was 0.11 measured at 630 nm by adding 0.4% crystal violet. The absorbance value of biofilms of *B. Coagulans* >0.1 indicates biofilm formation. Results obtained from studies to determine the effects of various gums (locust bean, pectin, xanthan, aljinate) on probiotic *B. coagulans* biofilm, The absorbance value measured at 630 nm with the addition of 0.4% crystal violet at the ratios of 2, 3, 4% respectively 0.27, 0.33 and 0.40 for the pectin gum, 0.44, 0.25 and 0.46 were measured for the xanthan gum, 1.68, 0.21 and 0.91 for the locus gum, 0.35, 0.32 and 0.26 for the aljinate gum. As a result of biofilm experiments, it has been shown that locus bean, xanthan, aljinate and pectin gums increase the biofilm-forming property of *B. coagulans*.

While the initial cell count of probiotic *B. coagulans* used in the study was 7.69 log cfu / mL, it was determined that various gums increased the number of *B. coagulans* at the end of incubation. As a result of the addition of pectin gum, an increase of 0.22 log cfu / mL, an increase of 1.02 log cfu / mL and an increase of 1.51 log cfu / mL occurred at the rates of 2, 3, 4%, respectively. As a result of the addition of xanthan gum, a decrease of 0.27 log cfu / mL, an increase of 0.51 log cfu / mL and an increase of 2.26 log cfu / mL were observed at the rates of 2, 3, 4%, respectively. As a result of the addition of locus bean gum, an increase of 0.35 log cfu / mL, an increase of 1.06 log cfu / mL and an increase of 1.18 log cfu / mL occurred at the rates of 2, 3, 4%, respectively. As a result of the addition of aljinate gum, there was an increase of 0.41 log cfu / mL, 1.5 log cfu / mL and 1.78 log cfu / mL, respectively, at the rates of 2, 3, 4%. This increase showed that all used gums had a positive effect on *B. coagulans* bacteria growth.

Keywords: *B. coagulans*, biofilm, probiotic, gum

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Prebiyotikler, sağlığın korunması ve devam etmesi için bağırsak mikrobiyotasının seçici uyarımında önemli yere sahiptir. Prebiyotiklerin bir gıda ürünü şeklinde kullanılabilmesi için, iyi üretim koşullarına uygun, değişmemiş, bozulmamış biçimde bağırsakta bulunması gerekmektedir (Katia ark., 2014; Van den Abbeele ark., 2013). Selüloz, inülin, yeniden kullanılabilir nişasta, hemiselüloz veya gamlar gibi polisakkaritlerin potansiyel prebiyotikler olabileceğiyle ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Konunun hala güncel olması nedeniyle birçok araştırma da yapılmaya devam etmektedir (Baurhoo ark., 2007).

Kıvam arttırıcılar ve gamlar tatsız olsalar da gıdaların lezzetlerine doğrudan etki etmektedir (Godshall, 1997). Gamlar, genellikle gıdanın yapısını iyileştirme, nem kaybını azaltma, nişasta retrogradasyonunu yavaşlatma, ürünün kalitesini geliştirme amacıyla kıvam arttırıcı, emülsifiye edici, kayganlaştırıcı ve stabilizatör olarak gıda endüstrisinde güvenilir kabul edilen GRAS (Generally Regarded As Safe) statüsünde yer almakta ve Kodeks Alimentarius Komisyonu tarafından verilen E-kodları ile sınıflandırılmaktadır (Çizelge 2.1.) (Burey ve ark., 2008, Milani ve Melaki, 2012, Anonim 2013).

Ksantan gam, başta gıda endüstrisi olmak üzere tarım, tıp, kimya, kozmetik ve tekstil alanlarda az miktarda yüksek viskozite sağlanması, geniş sıcaklık ve pH aralıklarında yüksek stabilite sağlamasından, reolojik özelliklerinin olmasından, diğer polimerlerle sinerjistik etki gösterebilmesinden, enzimatik bozulmalara karşı dayanıklı olmasından dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır (Faria ve ark. 2011, Niknezhad ve ark. 2016, Garcia-Ochoa ve ark. 2000).

Aljinatların, bağırsakta özellikle *Bacteroides ovatus* tarafından fermantasyonu sonucu, kısa zincirli yağ asitleri (SCFA) önemli miktarda oluşur. Kısa zincirli yağ asitleri, bağırsak epitel hücreleri ve bağışıklık hücreleri için kritik bir enerji kaynağı olması, bağırsak sağlığının korunmasında ve kolon hastalıklarının gelişiminin önlenmesinde önemli bir yere sahip olmasından dolayı

fonksiyonel bir gıda kaynağı olarak tüketilmektedirler (O'Sullivan ark. 2010; Shang, Q. ark., 2018).

Pektin, soğukta ve asitli ortamda çözülebilen iyonik stabilizör olup; gıdalarda jelleştirme, kıvam verme, emülsifiye etme, stabilite sağlama amacıyla kullanılır (Anon., 1992; Dickinson, 2003). FAO/WHO tarafından pektinin doğal katkı maddesi olarak günlük kullanım miktarına sınır getirmemektedir (Anon., 1992). TGKY'ye göre de pektin gıda katkı maddesi olarak değerlendirilmemektedir (Anon., 1977). Pektin endüstriyel olarak gıda, ilaç ve kozmetik alanlarında kullanılmaktadır (Ciriminna ve ark. 2016).

Keçi boynuzu gamı, yapısında bulunan protein ve selüloz gibi safsızlıklar sebebiyle hafif sarıya çalan beyazımsı renkte, kokusuz bir gam olup sıcak suda çözünebiliyorken etanolde çözünmez. Gıdalarda jelleştirici, kıvamlaştırıcı ve su bağlayıcı olarak kullanılmaktadır (Demirtaş, 2007).

Son yıllarda sindirime uğramadan kalın bağırsağa gelmesinden dolayı önemi artan gıdaların prebiyotik özellikleriyle patojenik bakteri türlerinin sayısını azaltmak, konakçı üzerinde olumlu etkisi olan mikroorganizmaların büyümesi üzerine olumlu katkılarının olduğu belirlenmiş ve bu nedenle de konu üzerine çeşitli yöntemler geliştirilmeye ve kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemlerden birisi de organizmada ki normal mikrobiyotanın iyileşmesini sağlayabilmek için düzenleyici ve destekleyici probiyotik özellik taşıyan mikroorganizmalardan yararlanmaktır (Kandil ve ark. 2017).

Probiyotik terimi “Pro” ve “biota” diye iki kısımdan oluşup “for life” (yaşam için) anlamına gelip ilk kez 1954 yılında antibiyotik teriminin anlamca karşıtı, bazı yararlı mikroorganizmaların yararlı etkileri şeklinde tanımlanmıştır (Coşkun, 2006). Gıdaların üretiminde en çok kullanılan probiyotikler *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* olmakla birlikte bu bakterilere oranla daha az bilinen *Escherichia*, *Saccharomyces*, *Enterococcus* ve spor oluşturan *Brevibacillus*, *Bacillus* ve *Sporolactobacillus* cinsi bakterilerden de faydalanılmaktadır (Sanders ve ark., 2003; Patel ve ark., 2009). *Bacillus* spp. diğer probiyotik

mikroorganizmalarda da olduğu gibi; bağışıklık sistemini düzenlemesi, antimikrobiyel madde üretmesi ve bağırsak mikrobiyotasını iyileştirmesi şeklinde özelliklere sahiptir (Cutting, 2002). Antimikrobiyel madde sentezleyen *Bacillus*'lar; *B. coagulans*, *B. cereus*, *B. Amyloliquifaciens*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. thermoleovorans* ve *B. licheniformis*'tir (Lisoba ve ark, 2006; Xie ve ark, 2009).

B. coagulans, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa Birliği Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından güvenli olarak bildirilmiş ve GRAS (Generally Recognized As Safe) ve QPS (Qualified Presumption of Safety) listesinde yer almaktadır (EFSA, 2013).

Konu ile ilgili yapılan birçok çalışmada, laktik asit bakterilerine ait biyofilmlerin veya ekzopolisakkaritlerin biyokoruyucu olarak kullanılabileceği ve bunun yanı sıra gıda ürününün tekstürünü geliştirmede kullanılabileceği bildirilmiştir. Ayrıca, biyofilmlerin elde edildiği gelişme ortamının bileşiminin, elde edilecek biyofilm miktarı ile direkt ilişkili olduğu belirlenmiştir. Ancak, probiyotik kültürlerden elde edilen biyofilmlerin üretiminde prebiyotik katkıların rolüyle ilgili çok az çalışma yer almaktadır (Fujishige ve ark., 2006).

Bu çalışmada, bazı gamlar ortama ilave edildiği takdirde, *Bacillus coagulans*'ın gelişimi üzerine ve yine söz konusu gamların, *Bacillus coagulans*'ın biyofilm üretme özelliği üzerine olan etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Araştırmada öncelikle *Bacillus coagulans* 'ın başlangıç hücre sayısı tespit edilip, daha sonra çeşitli gamların (pektin, aljinat, ksantan ve keçi boynuzu) *Bacillus coagulans* gelişme ortamına ilavesi edildikten sonra inkübasyon sonrası hücre sayımı yapılarak, gamların etkisi araştırılmıştır. Ayrıca *Bacillus coagulans*'ın tek başına ve çeşitli gamların (pektin, aljinat, ksantan ve keçi boynuzu) ilavesiyle biyofilm üretme özelliği belirlenmiştir.

Araştırmada Nutrient agar yayma ekim yöntemi kullanılarak *B. coagulans* hücre sayısı tespit edilmiştir. *Bacillus coagulans* 'ın hücre sayısını tespit etmek için çeşitli seyreltmeler yapılarak ekimi yapılmış ve 48 saat inokülasyonu sonucunda

hücre sayısı tespit edilmiştir. Çeşitli gamlardan (pektin, aljinat, ksantan ve keçi boynuzu) ön denemelerce alınan miktarlara *Bacillus coagulans* ilavesi yapıp seyreltme işlemi gerçekleştirerek 48 saat inokülasyonu sonucundaki hücre sayısı tespit edilmiştir. *Bacillus coagulans*'ın Nutrient agardaki sayımı sonucu hücre sayısı $0. \times 10^8$ kob/mL bulunmuştur. Gamların *Bacillus coagulans* ilavesiyle hücre sayısı pektin ilavesinde $3,0 \log 10^8$ kob/mL, keçi boynuzu ilavesinde $7.47 \log 10^8$ kob/mL, aljinat ilavesinde $4,35 \log 10^8$ kob/mL ve ksantan ilavesinde $9.05 \log 10^8$ kob/mL bulunmuştur. Çalışmadan elde edilen sonuca göre *Bacillus coagulans*'ın sayısında prebiyotik gamların ilavesi sonucu hücre artışı olduğu görülmüştür. Bu artış gamların *Bacillus coagulans*'ın gelişimi üzerine olumlu etkisi olduğunu göstermiştir.

Denemelerde kullanılan *Bacillus coagulans* 'ın biyofilm yaptığı tespit edilmiştir. Biyofilm elde edildikten sonra bakteriye tutunan hücre sayısını hesaplamak için çeşitli gamların(pektin, aljinat, ksantan ve keçi boynuzu)ilavesi yapılarak belirli seyreltmeler elde edilip ekim yapılmış ve 48 saat sonra bakteriye tutunan hücre sayısı tespit edilmiştir. *Bacillus coagulans* biyofimlerinin %4 kristal viyole ilavesiyle 630 nm'de ölçülen absorbans değeri 0.106 bulunmuştur. Absorbans değerinin >0.1 olması biyofilm oluştuğunun bir göstergesidir (Kubota ve ark, 2008; Ünal Turhan ve ark, 2017). Pektin, aljinat, ksantan ve keçi boynuzu gamlarının ilavesiyle elde edilen *Bacillus coagulans* biyofimlerinin 630 nm'de ölçülen biyokütle sonuçları sırasıyla 0.429, 0.370, 0.252 ve 1.130 olarak tespit edilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuca göre çeşitli gamların ilavesiyle birlikte *Bacillus coagulans*'ın biyofilm oluşturma özelliğinde bir artış olduğu görülmüştür. Bu artış gamların *Bacillus coagulans*'ı içinde tutacak şekilde biyofilm oluşturarak kolon içerisinde varlığını koruyup, diğer antibiyotik veya patojenlere karşı etkinliğini devam ettirmek istediğini göstermektedir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca değerli yardım ve katkılarını, maddi ve manevi her türlü desteğini benden esirgemeyen sayın danışman hocam Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA'ya, çalışma aşamasında sürekli bilgi alışverişinde bulunduğum, tezimin her aşamasında emeği geçen, her konuda ve her zaman yardımcı olan sayın hocam Ar. Gör. Gözde KONURAY'a, yapıcı ve yönlendirici fikirleriyle katkıda bulunan sayın hocam Doç. Dr. Emel ÜNAL TURHAN'a, tezimin yazım aşaması ve değerlendirilmesinde katkıda bulunan sayın hocam Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen sevgili annem Naime KAHRAMAN ve sevgili babam Yusuf KAHRAMAN'a, beni her zaman dinleyen ve sorunlarımın çözüm getiren erkek kardeşim Uğur Can KAHRAMAN ve kız kardeşim Fatma Melisa KAHRAMAN'a, hayatlarımızı birleştirdiğimiz günden bu yana varlığıyla güçlü hissettiren ve her konuda destek olan sevgili eşim Atahan UYANDIRAN'a ve biricik oğlum Güney UYANDIRAN'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
KISALTMALAR.....	XIV
1.GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	9
2.1. Prebiyotikler ile Pektin, Aljinat, Ksantan ve Keçi boynuzu Gamlarının Prebiyotik Olarak Önemi.....	9
2.1.1. Prebiyotiklerin Sağlık Üzerine Etkileri:.....	10
2.2. Probiyotikler ve <i>Bacillus coagulans</i> 'ın Probiyotik Olarak Önemi	23
2.3. Biyofilm Oluşumu ve <i>Bacillus coagulans</i> 'ın Biyofilm Sentezleme Özelliği	31
3. MATERYAL VE METOD.....	39
3.1. Materyal.....	39
3.1.1. Mikroorganizmalar.....	39
3.1.2. Besiyerleri, Çözeltiler ve Kimyasallar	39
3.2. Metod.....	40
3.2.1. <i>Bacillus coagulans</i> (GBI-30, 6086) Sayısının Belirlenmesi	40
3.2.2. Çeşitli Gamların İlavesiyle <i>Bacillus coagulans</i> (GBI-30, 6086) Sayısındaki Değişimin Belirlenmesi	40
3.2.2.1. Bazı Gamların <i>Bacillus coagulans</i> (GBI-30, 6086) Gelişimi Üzerine Etkisi.....	41

3.2.3. <i>Bacillus coagulans</i> (GBI-30, 6086)'ın Biyofilm Üretme Özelliğinin Belirlenmesi	42
3.2.4. Çeşitli Gamların <i>Bacillus coagulans</i> Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	44
3.2.5. İstatistiksel Analizler.....	45
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	47
4.1. Çeşitli Gamların İlavesinin <i>Bacillus coagulans</i> (GBI-30, 6086)' un Gelişimi Üzerine Etkisi.....	47
4.2. <i>Bacillus coagulans</i> 'un Biyofilm Üretme Özelliği	50
4.3. Çeşitli Gamların <i>Bacillus coagulans</i> (GBI-30, 6086) Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisi.....	50
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	81

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 2.1. Gıda endüstrisinde kullanılan gamların özellikleri.....	14
Çizelge 2.3. Biyofilm oluşumunu etkileyen iç ve dış faktörler	36
Çizelge 3.1. Araştırmada Kullanılan Besiyerleri.....	39
Çizelge 4.1. Farklı oranlardaki gumların <i>Bacillus coagulans</i> gelişimi üzerine etkisin (log kob/mL).....	48
Çizelge 4.2. Çeşitli gamların <i>Bacillus coagulans</i> biyofilm oluşumu üzerine etkisi (Absorbans).....	51



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 2.1.	Gamların elde edildiği kaynaklara göre sınıflandırılması.....	17
Şekil 2.2.	Probiyotik mikroorganizmalarda aranan özellikler	25
Şekil 2.3.	<i>Bacillus coagulans</i> 'ın hücre şekli.....	29
Şekil 2.4.	Stafilokoklarda Biyofilm Oluşum Modeli.....	35
Şekil 3.1.	Pektin gaminin <i>Bacillus coagulans</i> (GBI-30, 6086)'a etkisinin belirlenmesi.	41
Şekil 3.2.	<i>Bacillus coagulans</i> (GBI-30, 6086) biyofilm üretme özelliğinin belirlenmesi.	43
Şekil 3.3.	Çeşitli gamların <i>Bacillus coagulans</i> (GBI-30, 6086) biyofilmine tutunan hücre sayılarının belirlenmesi.....	45
Şekil 4.1.	Farklı oranlardaki gumların <i>Bacillus coagulans</i> 'un gelişimi üzerine etkisinin sonucu oluşan koloni sayısındaki değişime ilişkin sonuçları	49
Şekil 4.2.	Farklı oranlardaki gumların <i>Bacillus coagulans</i> (GBI-30, 6086)'ın biyofilm özelliklerinin değişimine ilişkin sonuçları	52



KISALTMALAR

GRAS	: Generally Regarded As Safe
SCFA	: Kısa zincirli yağ asitleri
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
TGKY	: Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği
FDA	: Gıda ve İlaç Dairesi
EFSA	: Avrupa Birliği Gıda Güvenliği Otoritesi
QPS	: Qualified Presumption of Safety
FED	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
HM	: Yüksek metoksilli pektin
LM	: Düşük metoksilli pektin
CMC	: Karboksimetil selüloz
LABIP	: Laktik Asit Bakteri Endüstriyel Platformu
EPS	: Genleştirilmiş Polistiren Sert Köpük
HACCP	: Tehlike Analizleri ve Kritik Kontrol Noktaları
GOS	: Galaktooligosakkaritler
FOS	: Fruktooligosakkaritler
XOS	: Ksilooligosakkaritler
TOS	: Transgalaktooligosakkaritler
IMO	: İzomaltooligosakkaritler
SBOS	: Soya oligosakkaritler
KZYA	: Zincirli Serbest Yağ Asidi
ISAPP	: Uluslararası Bilimsel Probiyotikler ve Prebiyotikler Derneği
GİS	: Gastrointestinal Sistem
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
ELISA	: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
TSB	: Triptik Soy Broth

NA : Nutrient Agar
NB : Nutrient Broth
SPSS : Statistical Package for the Social Sciences
PVC : Polivinil klorür
mL : Mililitre
NaCl : Sodyum Klor
WPC : Peyniraltı suyu
TSP : Bitki Sağlık Sertifikası



1.GİRİŞ

Konakçının sağlığına faydalı olan, probiyotik mikroorganizmaların gelişimini teşvik eden, faaliyetlerini seçici olarak uyararak, enteropatojen olmayanların kolonizasyonunu kolaylaştıran, fermente olabilen, sindirime uğramayan gıda bileşenlerine prebiyotik adı verilmektedir (Harman and Knol, 2006).

Prebiyotikler gastrointestinal kanalda bulunan asitler, proteazlar ve safra tuzlarına karşı direnç göstererek, bağırsak mikrobiyotası üzerine olumlu katkılar sağlar. Canlının, bağırsak mikrobiyotasını seçici olarak uyararak, böylece bakterilerle rekabeti ortadan kaldırmış olur. Bağırsak mikrobiyotasının uyarımıyla kısa zincirli yağ asitlerinin (SCFA) seviyesi etkilenir ve fermantasyon aktivitesi tespit edilmiş olur. Magnezyum ve kalsiyum gibi minerallerin emilimini artırır. Bağırsağın pH'sını azaltıp suyun osmotik tutulumunu sağlar. Belirli patojenleri inaktive etmek için antibiyotiklere alternatif olarak görülür (Socha ark., 2002).

Prebiyotikler sindirim sisteminin üst kısımlarındayken sindirime uğramadan bağırsak sistemine geçmiş olur. Buradayken kolon mikrobiyotasınca seçici olarak fermantasyona uğrar. Fermantasyonla birlikte, dışkı kütesinin artmasını, kısa zincirli yağ asitlerinin artmasını, kolon pH'sının ölçülü bir şekilde azalmasını, fekal enzimlerle azotlu son ürünlerin azalmasını ve canlı için immünolojik sistemin gelişimini sağlar. Sağlığın korunması ve devam etmesi için bağırsak mikrobiyotasının aktivitesini gerçekleştirmesi ve büyümesinde seçici uyarımında prebiyotikler önemli yere sahiptir. Prebiyotiklerin bir gıda ürünü şeklinde kullanımı için iyi üretim uygulama koşullarına uygun, değişmemiş, bozulmamış ve bağırsak mikrobiyotasının metabolizması için mevcut olması gereklidir (Katia ark., 2014; Van den Abbeele ark., 2013).

Prebiyotik etki, genel anlamda fonksiyonel gıdaların tüketilmesiyle ve probiyotiklerin sayısı ve aktivitesinin artmasıyla birlikte prebiyotiklerin önemi de artmaktadır (Gibson ve Roberfroid 2008, Akhter ve ark.2015, Yahfoufi ve ark.

2018).

Bitki tohumlarının endosperminden, deniz yosunlarından, bakterilerden, tohum ve ağaç sızıntıları, çekirdek ekstraktları gibi bitkisel ve hayvansal kaynaklardan, polisakkaritlerin kimyasal modifikasyonlarıyla ya da fermantasyonla elde edilen kompleks polisakkaritler olup suda hem dağılabilme hem de çözünbilme özelliğine sahip polimerik maddelere gam denir. Gamlar, kimyasal olarak karbonhidratlarla ilişkili olup nişasta, şeker, selüloz, asit, karbon, hidrojen ve oksijen tuzlarından oluşmakta, ayrıca magnezyum, potasyum, kalsiyum ve bazen azot da içermektedirler (Phillips ve Williams 2000, Imeson 2010, Wüstenberg 2014).

Gamlarda bulunan polisakkaritlerin çoğu mikroorganizmalar tarafından parçalanabilmekte olup, insan bağırsağında gamları parçalayabilecek enzimler bulunmamasından dolayı sindirilememektedir. Son yıllarda sindirime uğramadan kalın bağırsağa gelmesinden dolayı önemi artan gamların prebiyotik özellikleriyle patojenik bakteri türlerinin sayısını azaltmak, konakçı üzerinde olumlu etkisi olan mikroorganizmaların büyümesini teşvik amacıyla yöntemler geliştirilmektedir. Bu yöntemlerden birisi de organizmada ki normal mikrobiyotanın iyileşmesini sağlayabilmek için düzenleyici ve destekleyici mikroorganizmalardan yani probiyotiklerden yararlanılmaktadır (Kandil ve ark. 2017).

Gıdalara ilave edilerek stabilizasyon sağlayan, sağlık açısından hiç bir sakıncasının olmaması, nötral tatta, ısı değişimlerinden karşı etkilenmemesi, kolayca çözünbilir olması, katıldıkları üründe istenilen yapıyı oluşturması ve maliyetlerinin düşük olması önemli özellikleridir (Güven ve Hayaloğlu, 2001). Ksantan, pektin, nişasta, karragenan ve jelatin gibi stabilizörler reolojik özellikleri nedeniyle gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Marcotte ve ark., 2001).

Azot, potasyum fosfat, karbonhidrat ve diğer iz elementlerinin olduğu ortamda lahanalar ve karnabahar gibi sebzelerde doğal olarak bulunan *Xanthomonas campestris* suşlarıyla aerobik fermentasyonu ile üretilen yapı olarak tekrarlanan

pentasakkarit birimleri içeren mikrobiyal hücre dışı heteropolisakkaritlere ksantan gam denir (Farhadi ve ark. 2012).

Ksantan gam, başta gıda endüstrisi olmak üzere tarım, tıp, kimya, kozmetik ve tekstil alanlarda az miktarda yüksek viskozite sağlanmasından, geniş sıcaklık ve pH aralıklarında yüksek stabilite sağlanmasından, reolojik özelliklerinin olmasından, diğer polimerlerle sinerjistik etki gösterebilmesinden, enzimatik bozulmalara karşı dayanıklı olmasından dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır (Faria ve ark. 2011, Niknezhad ve ark. 2016, Garcia-Ochoa ve ark. 2000).

Günümüzde *Xanthomonos* türleri kullanılarak, fermentasyonla ksantan gam üretimini gerçekleştirmede temel amaç üretim besiyerinde ucuz karbon ve nitrojen kaynaklar kullanıp düşük maliyete yüksek fayda sağlamaktır (Yoo ve Harcum 1999; Ben Salah ark., 2010; Gunasekar, Reshma, Treesa, Gowdhaman ve Ponnusami, 2014).

Aljinat gamı farklı türdeki alglerin hücre duvarından ekstrakte edilen, L-guluronik asit ile D mannuronik asit içeren, biyoyumlu, mukozaya yapışabilen, biyolojik olarak parçalanabilir olan heteropolisakkarit bir gamdır (Martín ark., 2015; Wani ark., 2016; Sarao ve Arora, 2017; Albadran ark., 2018, Rehm, 2009). Aljinatlar, aljinik asit olarak da adlandırılıp, zincir boyunca blok şeklinde olmayan bir düzende olup 1,4-bağlantılı β -D mannuronik asit ve α -L-gluronik asit yapılarını içeren doğrusal bir polisakarittir (O'Sullivan ark., 2010).

Aljinatın, bağırsak mikrobiyotası, özellikle *Bacteroides ovatus* bakterisi tarafından fermentasyonu sonucu, kısa zincirli yağ asitlerini (SCFA) önemli miktarda üretirler. Kısa zincirli yağ asitlerinin (SCFA) bağırsak epitel hücreleri ve bağışıklık hücreleri için kritik bir enerji kaynağı olması, bağırsak sağlığının korunmasında ve kolon hastalıklarının gelişiminin önlenmesinde önemli bir yere sahip olmasından dolayı fonksiyonel bir gıda kaynağı olarak tüketilmektedirler (O'Sullivan ark., 2010; Shang, Q. ark., 2018). Daha önce yapılan çalışmalarda aljinatın ve daha düşük molekül ağırlıklı türevlerinin *B. ovatus*'un yanı sıra bağırsaktaki *Bifidobacterium spp.* ve *Lactobacillus spp.* büyümesini de uyardığı

görülmüştür (Ramnani ark., 2012).

Pektin gamı, kısmen metille esterleştirilmiş galakturonik asit moleküllerinden oluşmuş anyonik bir polisakkarittir (Beaulieu ve ark., 2001; Ötleş ve Pire, 1999). Pektin gamı, ticari olarak genellikle turunçgil kabukları ve elma posasından elde edilerek, gıdalarda emülgatör, stabilizatör ve jelleştirici olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Harholt ve ark. 2010, Ciriminna ve ark. 2015). Pektin gamı, bağırsakta faydalı bakterilerce fermente edilebilmekte ve bakterilerin aktivitelerini arttırmakta, gastrik boşalma zamanını azaltmakta, sindirim sistemini olumlu yönde geliştirmekte ve mineral absorpsiyonunu olumlu yönde etkilemektedir (Wüstenberg 2014, Chung ve ark. 2016, Chung ve ark. 2017).

Keçi boynuzunun asite dayanıklı, yüksek molekül ağırlığına sahip, iyonik karakterde olmayıp ılık suda çözülebilen, glikozidik bağlarla bağlı galaktopiranoz ve mannopiranoz birimlerini içeren hidrokolloidal polisakkaritlerdir (Köksel, 2005). Keçi boynuzu gamının, tek başına jel oluşturma yeteneği olmayıp agar ve karragenan jellerinde istenilen elastikiyeti sağlar ve büzülmeyi geciktirir. Az miktarda kullanıldığında bile alkali ortamda jelleşme görülebilmektedir. Kıvam verici olarak kullanılmaktadır. Yoğurтта su salmayı önleyebilmek için diğer hidrokolloidlerle birlikte kullanılmaktadır. Keçi boynuzu gamı, gıda endüstrisinde dondurma, şekerleme, peynir, meyve turtaları, çorbalar, konserve etler, fırıncılık ürünleri ve hayvan gıdaları başta olmak üzere birçok gıda da yaygın olarak kullanılmaktadır (Battle ve Tous 1997).

Probiyotik ve prebiyotikler fonksiyonel gıdalar olarak bilinmektedir. Probiyotikler canlıların bağırsak mikrobiyotasını olumlu yönde değiştirip patojenlere karşı direnci arttıran mikrobiyal gıda kaynaklarıdır (Soccol ve ark. 2010, Tripathi ve Giri 2014).

Besin öğeleri kısa sürede mikrobiyotayı değiştirmektedir. Bağırsak mukozasında 200 m² alan içerisinde yaklaşık 500 farklı mikroorganizma olduğu tespit edilmiştir. Sağlıklı bir insanın sindirim sistemindeki yararlı bakterilerin zararlı bakterileri kontrol altında tutması, immün fonksiyonlarının düzenlenmesine

yardımcı olması ve besin ögesi hasarların önlenmesi gibi durumlar beklenmektedir (Gill ve Guarner 2004, Oflaherty ve Klaenhammer 2010, Vural ve Çelen 2005).

Probiyotiklerin kan basıncının düşürülmesine, bağırsak mikrobiyotasının korunmasına, serum kolesterol seviyesinin düşürülmesine, bağışıklık sisteminin güçlenmesine ve antibiyotiklerin yol açtığı bağırsak enfeksiyonlarına karşı etkili olduğu saptanmıştır (Chandan, 1997; Holzapfel ve Schillinger, 2002; D'Aimmo ve ark., 2007; Araujo, 2010; Özden, 2005). Organik asitlerin ve amino asitlerin oluşumunu teşvik ettiği de çeşitli araştırmalarla belirlenmiştir (Markowiak ve Slizewska, 2017; Nova ark., 2007; Ouwehand ark., 1999; Sanders ark., 2007).

Probiyotiklerin en önemli özelliklerinden biri antimikrobiyel etki göstermesidir. Genellikle patojen mikroorganizmalarla yarışma halinde olup, ortam besininden patojen mikroorganizmaların beslenmesini engeller ve epitel hücreye diğer mikroorganizmalardan önce yapışarak, bu zararlı mikroorganizmaların koloni oluşturmasını ve gelişmesini engellerler. Bu şekilde enfeksiyon profilaksisine, enfeksiyonların tedavisine ve konakçısının bağırsak mikrobiyotasının dengesinin korunmasına yardımcı olmuş olurlar (Markowiak ve Slizewska, 2017).

Konakçının bağırsak mikrobiyotasına yararlı etkisi bulunan probiyotik mikroorganizmalar; midedeki asitten, ince bağırsaktaki alkali ortamdan ve kalın bağırsak mikrobiyotasından olumsuz etkilendiğinden, kalın bağırsakta kolonize olamamaktadır. Söz konusu bu olumsuzlukların giderilmesinde yani kalın bağırsaktaki sınırlı sayıdaki yerleşik mikroorganizma türünün gelişmesinde, aktivitesinin artmasında uyarıcı etki gösteren prebiyotiklerin kullanılması gerektiği öne çıkmaktadır (Godshall, 1997).

Tüketicilerin sağlık konusunda farkındalığının artmasıyla birlikte probiyotik besin içeren fonksiyonel gıdalara olan talepte artmıştır (Liong, 2007).

Bacillus coagulans hızlı gelişebilmesi, organik asit üretme ve ısıya dirençli özelliklerinden dolayı öne çıkmaktadırlar (Hyronimus ve ark., 2000; Karri ve ark.,2016). *B. coagulans*'ın bazı suşları, yüksek sıcaklıkta, mide asiti gibi asitliğin yoğun olduğu ortamlarda bile canlılık özelliği gösterdiğini belirtmiştir. Bu

özelliklere sahip olan suşların sindirim sisteminde de canlı kalabilme olasılığının yüksek olduğunu belirtilmiştir (Endres ve ark., 2009).

B. coagulans, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa Birliği Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından güvenli olarak bildirilmekte olup GRAS (Generally Recognized As Safe) ve QPS (Qualified Presumption of Safety) listesinde yer almaktadır (EFSA, 2013). Yem katkısı şeklinde sindirimi artırma yoluyla hayvanların (kanatlı, domuz vb.) gelişimini önemli bir şekilde arttırmakla birlikte, bağırsaktaki *Escherichia coli* (*E. coli*) ve *Salmonella* gibi bakterilerin enfeksiyonları önlediği tespit edilmiştir (Aşan Özusağlam, 2010).

Bacillus coagulans suşlarının yüksek sıcaklıkta, düşük pH değerlerinde bile canlılık özelliği gösterdiği belirtilmiştir. (De Clerck ark., 2004). Bu özelliklere sahip olan suşların, sindirim sisteminde de canlı kalabilme olasılığının yüksek olduğu belirtilmiştir (Endres ve ark., 2009).

Probiyotik etkili mikroorganizmalar, organik asitler, yağ asitleri, hidrojen peroksit ve bakteriyosinler gibi antimikrobiyel maddeler üretmektedir. *B. coagulans* değişik koliform fekal bakteriler (başta *E.coli*) üzerine antimikrobiyel aktivite gösterip, laktik asit üretmektedir (Hyronimus ve ark., 2000; Bondi ve ark., 2000).

Biyofilmin temel birimi mikrokolonilerdir. Biyofilm, canlı veya cansız bir yüzeye tutunmuş bakterilerin salgıladıkları müköz yapı içinde bir araya gelerek oluşturduğu, “mikroplar şehri” olarak tanımlanmıştır (Watnick ve Kolter, 2000). Biyofilm, mikroplar tarafından oluşmuş, herhangi bir yüzeye veya birbirlerine yapışmış olarak yaşayan, büyüme durumları gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotip ve genotip özelliği gösteren ve mikroorganizma içinde gömülü olarak bulunan ekstraselüler polimerik maddeden oluşmuş matris olarak da tanımlanmıştır (Donlan ve Costerton, 2002).

Mikrobiyoloji tarihinin önemli bir kısmında, mikroorganizmalar planktonik hücreler olarak görülmüş olup zengin kültür ortamlarında gösterdikleri büyüme özelliklerine göre tanımlanmışlardır. İlk olarak van Leeuwenhoek tarafından

bildirilmiş olan ‘‘mikroorganizmalar bir yüzey üzerinde tutunarak yaşayabilen’’ Şeklindeki tanımıyla başlayıp mikrobiyolojinin yeniden keşfedilmesi sonucu gerçekleştirilen çalışmalar, yüzeyle ilişkili mikroorganizmaların (biyofilmler) nemini arttırmaktadır (Donlan, 2002).

Mikroorganizmalar vücudun herhangi bir yerinde sabit kalabilmek için bir takım stratejiler geliştirirler. Mikroorganizmaların yüzey proteinleri, konakçının fibrinojen, fibronektin, vitronektin, elastin gibi ekstrasellüler matriks proteinlerine tutunurlar. Bu adezin ve matriks proteinleri konakçı ile mikroorganizmanın yapışmasında anahtar rol oynarlar (Patti ve ark., 1994). Yapışma sonrası mikroorganizmalar bir yandan belli bir popülasyona ulaşmak için çoğalır diğer yandan da biyofilm oluşturma özelliğine göre biyofilm yapımına başlarlar. Mikroorganizmalar gerek in vitro gerekse in vivo ortamlarda biyofilm oluşturarak bir dizi avantaja sahip olurlar (Post ve ark., 2004).

Biyofilmler bakterileri nem, ısı ve pH değişiklikleri gibi çevresel değişimlerden ve ultraviyole ışığa maruz kalmanın getireceği zararlardan korur. Biyofilm oluşumunun getirdiği bir diğer avantaj ise besinlerin depolanması ve atıkların uzaklaştırılmasıdır. Bakterilerin kümeler halinde ve ekzopolisakkarit matriks içinde bulunmaları sonucunda fagosite edilmeleri güçleşir ve hümoral immün sistem bileşenlerinin bakterilere ulaşılmaları engellenmiş olur (ifti, 2005).

Biyofilm oluşumuna neden olan bakteriler; antimikrobiyel maddeler, sıcaklık, yüzey gerilimini değiştiren ajanlar, konakçı oksijen radikalleri, konakçıya ait fagositler, konakçı oksijen radikalleri, proteazlar gibi çeşitli durumlara karşı direnç gösterirler. Tabakalı dizilim nedeniyle yüzeyde bulunan çeşitli bakteriler mekanik kalkan etkisi gösterip katalaz, proteaz, lipaz salgılayarak antimikrobiyallere ve konak savunmasına karşı i yüzeyde mevcut olan bakterileri korumuş olurlar (Costerton ark., 1999; Arciola ark., 2001).

Biyofilm yapısında bulunan glikozidaz, hidrolaz, liyaz, esteraz ve diğer enzimlerin birçoğu düşük molekül ağırlıklı parçalanma ürünlerinin oluşumuna

sebepl olmakta, böylece biyofilimde tutunan bakterilerin metabolizmasında karbon ve enerji kaynağı olarak iş görmektedir (Allison, 2003).

Bakteriler de biyofilm gelişiminin başlaması için besinlerin ortamda olup olmaması gibi spesifik çevresel etmenlere bağılı olarak değişiklik göstermektedir. Biyofilm gelişimi besiyeri sağlandıkça devam etmektedir. Fakat ortamda bulunan besin maddeleri tükenince yüzeyle bağlantıları zayıflar ve planktonik modlarına geri dönerler. Açlık durumunda hücreleri yeni besin kaynakları aramaya yönlendirip ortamlara daha iyi adapte olmalarını sağlar (Kolter ve Tormo, 1993). Bu sebeple biyofilm oluşumunda yüzey koşullarının özellikleri bilinmesiyle birlikte açlık durumundaki metabolik yolun bütün biyofilm gelişim döngüsünü de etkileyebileceğı belirtilmiştir (O'Toole ve ark., 2000).

Biyofilm üreten probiyotik özellikteki bakterilerin, bağırsakta bulunan patojenlere karşı daha etkili koruyucu özellik gösterdiği tespit edilmiştir (Collins ve Hardt, 1980; Anand ve ark., 1984). Diğer yandan probiyotik özelliğe sahip olup biyofilm üreten birçok laktik asit bakterisi, bağırsak florasında, patojenik bakterilere karşı koruyucu etki göstermekte ve çeşitli fermente gıdaların tüketiminde de probiyotik etkiyi arttırdığı görülmüştür (Kumar ve Anand, 1998). Gıda işletmelerinde sağlıklı, hijyenik koşulların oluşması aşamalarında meydana gelen eksiklikler herhangi bir yüzeyde kolaylıkla biyofilm oluşmasına sebep olabilmektedir. Ayrıca bakterilerin biyofilm yapısı içinde genetik değişikliklere uğrayabileceğı düşünöldüğünde biyofilm oluşumunu engellemenin mümkün olmadığı durumlarda, gıda işletmelerinin HACCP kriterlerini çok iyi belirlemiş olması gerekmektedir. Biyofilme ilgili günümüze kadar birçok araştırma yapılmakla birlikte, biyofilm oluşumunun engellenmesiyle ilgili yeni teknolojik gelişmelerin takip edilmesi konunun önemini arttırmaktadır (Gün ve Ekinci, 2009).

Bu çalışmada, keçiyoynuzu, pektin, ksantan, aljinat gibi gamlar ortama ilave edilerek, *Bacillus coagulans*' ın gelişimi üzerine ve yine söz konusu gamların, *Bacillus coagulans*'ın biyofilm üretme özelliğı üzerine olan etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Prebiyotikler ile Pektin, Aljinat, Ksantan ve Keçi boynuzu Gamlarının Prebiyotik Olarak Önemi

Prebiyotikler insanın ince barsağında sindirilemeyen bunun yanı sıra, kalın bağırsağında, kısmen ya da tamamen fermente edilebilen gıdalar olarak tanımlanmıştır. Sindirim sistemi fonksiyonlarının yerine getirebilmesi için prebiyotik beslenmek zorundayız. Anne sütünde lif benzeri besin moleküllerinin bulunması bu durumu ispat eder niteliktedir. Süt içindeki oligosakkaritlerin enfeksiyonlara karşı koruduğu da tespit edilmiştir (İlkgül, 2005).

Gıdalar probiyotik veya prebiyotiklerle birlikte daha fonksiyonel hale getirilebilir (Berner ve O'Donnel, 1998). Yoğurt gibi fermente süt ürünlerinin üretiminde kullanılan laktik asit bakterileri, sindirim sisteminde canlı kalamadıkları için bu süt ürünlerine bifidobakteriler ve *Lactobacillus acidophilus* gibi probiyotikler eklenmektedir (Kalantzopoulos, 1997; Sağdıç ve ark., 2004). Son zamanlarda kapsül olarak, tablet şeklinde, dondurarak kurutulmuş olarak, bu mikroorganizmalar ticari olarak satılmaktadır (Vaughan ve Mollet, 1999). Probiyotikler ve prebiyotiklerin aynı ürün içinde olması her ikisinin fonksiyonel etkisinden simbiyotik şekilde yararlanılmasını sağlar (Holzapfel ve Schillinger, 2002).

Doğal gıdaların yanında, bazı yapay üretim sonucu fruktooligosakkaritler, laktuloz, siklodekstrinler galaktooligosakkaritler, maltooligosakkaritler ve laktosakkarozlar gibi prebiyotikler elde edilmektedir. Bu oligosakkaritlerin büyük bir kısmını, laktuloz oluşturur. Ayrıca, oligofruktoz ve inulin gibi fruktanlar, birçok probiyotikle kombine olan ve daha etkili olduğu düşünülen yapay prebiyotiklerdir (Markowiak ve Slizewska, 2017).

Disakkaritler (inülin, laktuloz), oligosakkaritler (soya, maltoz ve ksiloz) ve galaktoolisakkaritler (galaktoz) probiyotiklerin besin kaynağıdır. Bazı nişastalar da ince bağırsaktan geçerken sindirimden kaçır ve kolona bağırsak bakterilerinin

(Bifidobakteriler, Laktobasiller, Enterokoklar ve Streptokokların) kullanabileceği fermente olabilir karbonhidrat kaynağı (turşu, peynir, yoğurt, çiğ sucuk, yulaf, keten tohumu, çilek, kuşkonmaz, soğan, sarımsak, hindiba, yeşil sebzeler, baklagiller, yulaf, arpa, buğday, şarap, bira, kırmızı ve kefir) haline gelirler (Crittenden, 2001).

Prebiyotiklerin, bağırsak bakterileri veya birçok gen için seçiciliğinin hariç tutulması durumunda diyet lifi olarak da adlandırılmasına sebep olmuştur. Fakat FAO'nun yaptığı açıklamaya göre diyet lifi ile prebiyotiklerin farkı "prebiyotik konağın sağlığı üzerine yarar sağlayan, canlı olmayan gıda bileşenidir" tanımlamasıdır. Dolayısıyla diyet lifinin prebiyotik etkinliğinden bahsedebilmek için bağırsaklarda bulunan sağlığa faydalı mikroorganizmaları olumlu yönde etkiliyor olması gerekmektedir. Bu tanımlamaya göre bir prebiyotik diyet lifi olabilir ancak bir diyet lifi bir prebiyotik olmak zorunda değildir (Karabıyıklı ve Donat, 2019).

Prebiyotikler, canlıdaki sindirim enzimleri tarafından sindirime uğramayan dirençli kısa zincirli karbonhidrat olarak bilinmektedir. Prebiyotikler %80'lik etanol içindeyken genellikle çözülebilmektedir. Prebiyotiklerin aktif olmayan gıda bileşeni olmasıyla kolonda fermente olabilmesi bağırsak mikrobiyotasına katkı sağlamaktadır. Sadece sindirilemeyen karbonhidratlar değil, dirençli nişasta ve şeker polyoelleri de prebiyotik özelliği göstermektedir. Bütün karbonhidratlar prebiyotik özellik göstermez. Sindirilemeyen karbonhidratların (özellikle olisakkaritler) yanında bazı lipitler, bazı peptitler ve bazı proteinler de prebiyotik özellik göstermektedir (Özyurt ve Ötleş, 2014).

2.1.1. Prebiyotiklerin Sağlık Üzerine Etkileri:

Prebiyotiklerin sağlık üzerine etkileri inceleyen birçok araştırmacı tarafından aşağıdaki gibi sıralanmıştır (İnanç, Şahin ve Çiçek 2005, de Morais 2016, Roberfroid 2000, Karaman ve Özcan 2018).

1. Kabızlığı rahatlatma; Kalın bağırsakta fermentasyon meydana gelmesiyle birlikte gaz oluşur ve dolayısıyla bağırsak hacmi artar. Prebiyotikler böyle bir durumda bağırsaklardan transit geçiş süresini azaltarak kabızlığı rahatlattığı görülmüştür.
2. Bağırsak mikrobiyotasını yenileme; çeşitli antibiyotik kullanımı, stres durumları, ishal veya kimyasal ilaçların yarattığı çeşitli sorunlarda, prebiyotikler bağırsak mikrobiyotasını yenileyebilmektedir. Özel bakteri grupları seçici olarak uyarılıp denge sağlanabilir. Bu durum birçok bakteri grubu için de geçerlidir. Bu, seçilen bakteri grubu prebiyotik üzerinde gelişerek doğrudan uyarılabileceği gibi seçilen bakteri grubu diğer bakteriler için uygun ortam yaratarak dolaylı da uyurabilmektedir.
3. Bağırsak pH'sını düşürme, kalın bağırsaktaki fermentasyon sonucu asit oluşumu görülür. Böyle bir pH düşüşü ile patojen bakterilere karşı koruma göstermektedir.
4. Bağırsakta Mg, Ca ve Fe iyonları gibi minerallerin ve vitaminlerin emilimini arttırmaktadır.
5. Tümör önleyici etkisi bulunmaktadır. Ayrıca kalsiyum- kısa zincirli yağ asiti etkileşimi mineral emilimini de arttırmaktadır.
6. Atopik bünyeye sahip kişilerin immün sistemini düzenlemeye katkısı bulunmaktadır.
7. Peptit duyarlılığını azaltıp atopiyi önleme gibi özelliği bulunmaktadır.
8. Kolesterolü, trigliserit ve serum lipit miktarını düzenlemektedir.
9. Toksik bakteriyel etkinliğini baskılamasıyla ve kısa zincirli yağ asitlerinin üretimiyle kolon kanseri riskinin indirgenmesinde rol oynamaktadır.
10. Uzun süreli kullanımları sonucunda kemik yoğunluğunu arttırmakta ve osteoporoz riskini azaltmaktadır.
11. Bebeklerde probiyotik sayısını arttırdığından gıda alerjilerini önlemede etkisi bulunmaktadır.

Birbirine bağlı monomerlerin sayısına göre prebiyotikler, disakkaritler (2 monomer), oligosakkaritler (3-10 monomerler) ve polisakkaritler (10'dan fazla monomer) şeklinde sınıflandırılırlar. İn vivo ve in vitro çalışmalarına göre fruktooligosakkaritler (FOS), ksilooligosakkaritler (XOS), galaktooligosakkaritler (GOS), transgalaktooligosakkaritler (TOS), izomaltooligosakkaritler (IMO) ve soya oligosakkaritleri (SBOS) içeren oligosakkaritler prebiyotiklerin sınıflandırılmasında uygunluk kriterlerini taşıdığı belirtilmiştir (Annison ark., 2003; Patterson ve Burkholder, 2003). Ayrıca, selüloz, inülin, yeniden kullanılabilir nişasta, hemiselüloz veya pektin gibi polisakkaritlerin potansiyel prebiyotikler olabileceğiyle ilgili fikirler yer almaktadır (Baurhoo ark., 2007).

Yapılan bir çalışmada, prebiyotiklerin faydalarının yanında aşırı miktarda prebiyotik tüketimi diyare, mide gazı, UV ışığa duyarlılık ve antibiyotiklerin neden olduğu, karaciğer zararı gibi durumlara sebebiyet verdiği belirlenmiştir (Schiffirin ark., 2007).

Prebiyotiklerin moleküler yapısı, bu moleküllerin fizyolojik etkileri ve bunların bağırsakta karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilmesini mikroorganizma çeşiti belirler. Prebiyotik aktiviteyi gösteren karbonhidratların çeşitli olmasına rağmen, uygulamadaki etkisini, genellikle *Bifidobacterium* cinsi bakterilerinin artırdığı kanıtlanmıştır (Schiffirin ark., 2007; Vulevic ark., 2008).

Cruz ve ark. (2013), oligofruktozların prebiyotik olarak kullanılmasının, yoğurdun reolojik, mikrobiyolojik ve fiziko-kimyasal özellikleri üzerine etkisini araştırmışlardır. Yoğurtlara %0, 2, 4, 6, 8 oranlarında oligofruktoz ilave edilerek üretimi gerçekleştirilmiştir. Örnekler arasında bakteri canlılığı bakımından önemli derecede farklılık görülmemiştir. Oligofruktoz konsantrasyonunun artmasıyla tiksotropi ve viskozite değerinin arttığı görülmüştür. %2,58 üzerinde oligofruktoz kullanımının tüketicilerce duyuşal olarak daha az beğenildiği tespit edilmiştir.

Yapılan bir önemli çalışma da bağırsak sağlığının doğrudan beyin ile bağlantılı olduğu ortaya çıkmaktadır (Mayer, 2011). Bağırsak mikrobiyotası, prebiyotikleri ve diyet polisakkaritlerini fermente ve hidrolize ederek, asetat, propiyonat ve

bütirat gibi SCFA'ları üretimini gerçekleştirmektedirler. SCFA'lar, konakçının enerji gereksinimi sağlamak için çeşitli metabolik faaliyetler ile yağ ve glikozun biyosentezinde kullanılırlar (Yıldırım ve Altun, 2014). SCFA'ların gıda-enerji alımı sırasında ve inflamatuvar süreçlerde düzenleyici etkisinin olduğu da bilinmektedir. Bu nedenle SCFA'lar besin alımının azalmasından ve tokluk hissini oluşmasından doğrudan ilişkilidirler (Everard ve Cani, 2013).

Gamlar, genellikle gıdanın yapısını iyileştirme, nem kaybını azaltma, nişasta retrogradasyonunu yavaşlatma, ürünün kalitesini geliştirme amacıyla kıvam arttırıcı, emülsifiye edici, kayganlaştırıcı ve stabilizatör olarak gıda endüstrisinde güvenilir kabul edilen GRAS (Generally Regarded As Safe) statüsünde yer almakta ve Kodeks Alimentarius Komisyonu tarafından verilen E-kodları ile sınıflandırılmaktadır (Çizelge 2.1.) (Burey ve ark. 2008, Milani ve Melaki, 2012, Anonim 2013).

Çizelge 2.1. Gıda endüstrisinde kullanılan gıdaların özellikleri (Burey ve ark. 2008, Milani ve Melaki,2012, Anonim 2013).

Gam	E - Kodu	Kaynak	Kimyasal Bileşimi	Fonksiyonel Özellikleri	Kullanıldığı Gıdalar
Aljinat	E 400	Kahverengi yosun özütü /aljinik asit türevleri	Mannuronik ve gluronik asit zincirleri	Stabilize edici, emülsüfiye edici, film oluşturucu, jelleştirici, yağ ikame edici	-Fırıncılık ürünleri -süt ürünleri -Jöle ve puding üretimi -Dondurulmuş gıdalar -Yağı azaltılmış margarin benzeri ürünler - Reçel,marmelat, jöle -Krema ve toz krema Aromalandırılmamış pastörize krema (yağı azaltılmış kremalar hariç)
Agar	E 406	Kırmızı alglerin hücre duvarı (<i>Phodophyceae</i>), <i>Gelidium</i> , <i>Gracilaria</i> ve <i>Pteroclararia</i> türleri	Galaktoz ve anhidrogalaktoz, düşük sülfat içeriği	Doku stabilizörü, inceltici madde	-Şekerlemeler ve tatlılar -Aroma ilavesiz, fermantasyonu devam eden krema ürünleri ve %20'den az yağ içeren ikame ürünler - Reçel, marmelat , jöle
Karragenan	E 407	<i>Phodophyceae</i> sınıfına dahil <i>Gigartinaceae</i> ve <i>Soliericeae</i> gibi kırmızı deniz yosunları	Anhidro-galaktoz birimleri ve değişen oranlarda sülfat grupları	Jelleştirici, kalınlaştırıcı ve sinerezisi kontrol edici, emülsiyonu stabilize edici	-Süt ürünleri - Fırıncılık - Et ve balık ürünleri -Jöle, tatlı ve meyveli ürünler - Salata sosları - Krema ve toz krema -Aroma ilavesiz pastörize krema (yağı azaltılmış kremalar hariç) - Aroma ilavesiz , fermantasyonu devam eden krema ürünleri ve %20'den az yağ içeren ikame ürünler -Aromalandırılmış fermente süt ürünleri - Reçel, marmelat, jöle -Bebek devam formülleri -Sıvı formdaki sofraadaki tatlandırıcılar

Çizelge 2.1.(devamı)

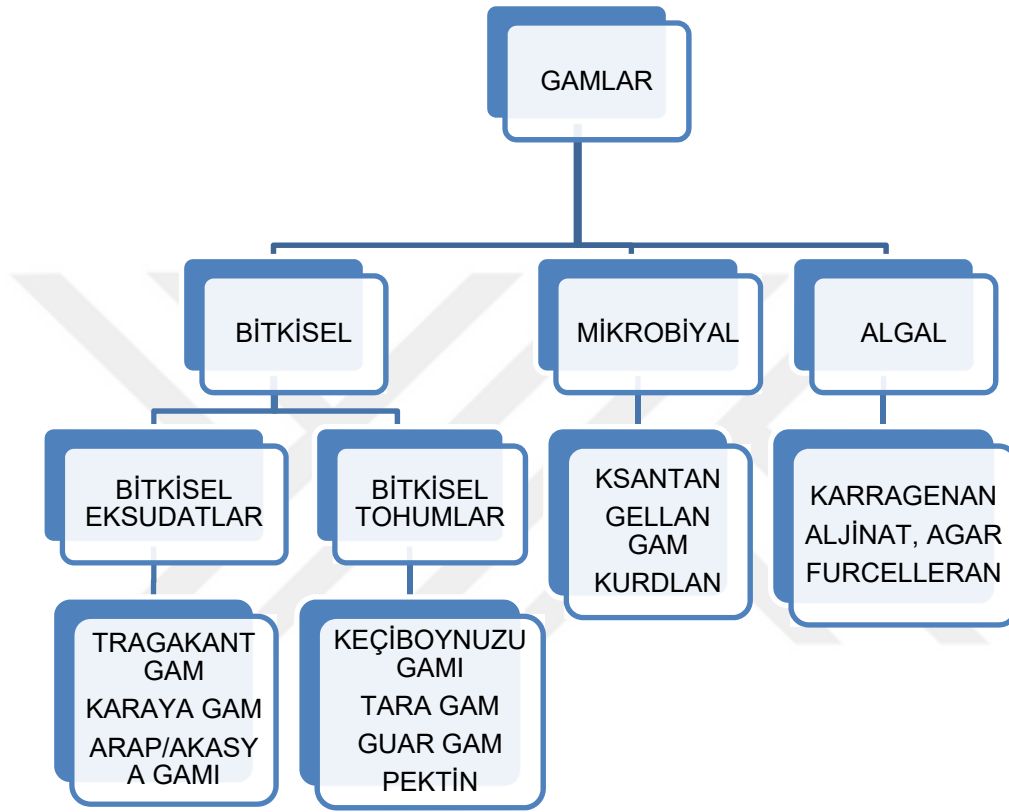
Keçiyoynuzu Gamı	E 410	Tohum endosperminin ekstratları (<i>Leguminosae</i>)	Mannoz ve galaktoz	Kıvam arttırıcı, jelleştirici ve su bağlayıcı	-Sosis, salam ve süt ürünleri - Aroma ilavesiz, fermantasyonu devam eden krema ürünleri ve %20'den az yağ içeren ikame ürünler - Reçel, marmelat, jöle - Sıvı formdaki sofradaki tatlandırıcılar - Bebek devam formülleri
Guar Gamı	E 412	Guar bitkisinin (<i>Cyamopsis tetragonolobus</i> , <i>Leguminosae</i> familyası) tohumları	Mannoz ve galaktoz	Kalınlaştırıcı, stabilizatör	-Süt ürünleri, sos ve çeşni - Aroma ilavesiz fermantasyonu devam eden krema ürünleri ve %20'den az yağ içeren ikame ürünler - Reçel, marmelat, jöle - Sıvı formdaki sofradaki tatlandırıcılar - Bebek devam formülleri
Tragakant Gamı	E 413	<i>Astragalus</i> cinsi baklagilden elde edilen bir eksuda	Galaktoz, ksiloz, früktoz ve arabinoz	Koyulaştırıcı, stabilizatör, su bağlayıcı	-Şekerleme, Dondurma, Krema - Sıvı formdaki sofradaki tatlandırıcılar
Arap Gamı Akasya Gamı	E 414	<i>Acacia Senegal</i> ağacının bitki öz suyu	Galaktoz, acabinoz, glukoronik asit, ramnoz	Emülsifiye edici, stabilizör, kalınlaştırıcı, tatlandırıcı, parlaticı	-Şekerleme, Fırıncılık ürünleri -Çikolata ürünleri - Sıvı formdaki sofradaki tatlandırıcılar -Şarap, üzüm şırası
Ksantan Gamı	E 415	<i>Xanthomonas Campestris</i> mikroorganizmalarından üretilen selüloz derivatı	Glukoz mannoz ve glukuronik asit	Emülsiyeye edici, kalınlaştırıcı ajan	-Fırıncılık, pasta ürünleri - Aroma ilavesiz, fermantasyonu devam eden krema ürünleri ve %20'den az yağ içeren ikame ürünler - Reçel, marmelat, jöle - Sıvı formdaki sofradaki tatlandırıcılar
Tara Gamı	E 417	<i>Caesalpinha spinosa</i> tohumlarının endospermi	Mannapiran oz ve galaktopiran oz	Stabilizör	-Dondurulmuş tatlılar -Krem peyniri ve fermente süt ürünleri

Çizelge 2.1.(devamı)

Gellan Gam	E 418	<i>Pseudomonas elodea</i> mikrobunun saf kültürü	Gulukronik asit, ramnoz glukoz	Jelleştirici ajan	-Şekerleme -Soslar, tart ve pudingler -Ekmek dolguları ve süt ürünleri
Curdlan Gam	E 424	<i>Agrobacterium radiobacter</i> 'in patojenik ve toksijenik olmayan suşu	Glukoz birimleri	Jelleştirme ajanı, kalınlaştırıcı ve bağlayıcı	-Tatlı ve şekerlemeler
Konjac	E 425	<i>Amorphophalus konjac</i> 'in yumruları	Mannan galaktoz oranı 6:1 olan lukoliz ve mannozil	Kalınlaştırıcı	-Erişte, jöle üretiminde
Pektin	E 440	Meyve özütü	Galakturonik asit ve ramnoz molekülleri	Jelleştirme, kıvam verme emülsifiye etme, stabilite sağlama	- Aroma ilavesiz , fermantasyonu devam eden krema ürünleri ve %20'den az yağ içeren ikame ürünler -Sadece elma kompostosu dışındaki meyve kompostoları -Reçel, marmelat, jöle - Sıvı formdaki sofradaki tatlandırıcılar -Bebek devam fomülleri -Ek gıda -Meyve sebze suyu nektarları

Gamlarda bulunan polisakkaritlerin çoğu mikroorganizmalar tarafından parçalanabilmekte olup, insan bağırsağında gamları parçalayabilecek enzimler bulunmamasından dolayı sindirilememektedir. Birçok çalışmada, sindirime uğramadan kalın bağırsağa gelmesinden dolayı önemi artan gamların prebiyotik özellikleriyle patojenik bakteri türlerinin sayısını azaltmak, konakçı üzerinde olumlu etkisi olan mikroorganizmaların büyümesini teşvik amacıyla yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden birisi de, organizmada ki normal mikrobiyotanın iyileşmesini sağlayabilmek için düzenleyici ve destekleyici mikroorganizmalardan probiyotiklerden yararlanılmaktadır (Kandil ve ark. 2017). Kıvam arttırıcılar ve gamlar tatsız olsalar da gıdaların lezzet ve tatlarına doğrudan etki etmektedir

(Godshall, 1997). Gamların elde edildiği kaynaklara göre sınıflandırılması şekil 2.1.'de gösterilmiştir (Hollingworth 2010, Imeson 2010, Wüstenberg 2014).



Şekil 2.1. Gamların elde edildiği kaynaklara göre sınıflandırılması (Hollingworth 2010, Imeson 2010, Wüstenberg 2014).

Gamlar gıdaların fonksiyonel ve tekstürel özelliklerine katkıda bulunmanın yanında ;

- LDL-kolesterol, toplam kolesterol ve glikoz oranını azaltarak kardiyovasküler hastalık ve diyabet riskini düşürme (Knopp ve ark. 1999, Moosa 2006, Al-Ghazzewi ve ark. 2007, Masood ve ark. 2007, Shahzadi ve ark. 2007, Kaur ve ark. 2009, Phillips ve Phillips 2011, Roberts 2011).

- Serumdaki üre azotunu önemli derecede azaltma (Bliss ve ark. 1996) gibi sağlık üzerine olumlu etkiler de gösterdiği bilinmektedir.

Bütün gamların ana özelliği kıvam arttırmak, yani viskoziteyi arttırmaktır.

Azot, potasyum fosfat, karbonhidrat ve diğer iz elementlerinin olduğu ortamda *Xanthomonas campestris* suşlarıyla aerobik fermentasyonu ile üretilen mikrobiyel hücre dışı heteropolisakkaritlere ksantan gam denir (Farhadi ve ark. 2012).

Ksantan gamının reolojik özelliğinden dolayı uzun süre emülsifiye edici gam kalınlaştırıcı olarak yer almaktadır. Şişeden kolayca akabilen, ağızda mükemmel dağılabilen salata soslarında kullanılmaktadır. Ksantan içeren nişasta bazlı (puding, muhallebi) tatlılarda daha iyi bir yapı sağlamıştır. Yine ksantan gamı kullanımıyla unlu gıdalarda daha iyi bir yapı ve hacim sağlanmıştır. Ksantan gamının reolojik özelliğinden dolayı şuruplarda daha kolay ve mükemmel akmasına olanak sağlamıştır. (Kim ve ark. 2014a,b, Cho ve Yoo 2015). Ksantan gam ayrıca sürülebilir peynirlerde stabilize edici olarak kullanılmaktadır (Abd El-Salam ve ark. 1994).

Ksantan gam soğuk ya da sıcak suda iyi çözünebilmektedir. Ksantan gamının polielektrolit özelliğinden kaynaklanmaktadır. Ksantanın çözelti hali düşük konsantrasyonda bile yüksek viskozdur (Schroter ve ark. 2001). Ksantan gamın toksikolojik olup olmadığı ortaya çıkmıştır. Bu çalışmalar sonucunda cildi ve gözü tahriş etmediği, büyüme üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı da tespit edilmiştir. Bu nedenle Food and Drug Administration (FDA) tarafından gıdalarda ksantan gamının sınırsız kullanımına izin verilmiştir (Kennedy ve Bradshaw 1984).

Yapılan çalışmalar ksantan biyosentezi ve mikrobiyel gelişimler için nötral pH'nın en uygun olduğu görülmüştür (Barua ve ark. 2016, Lopes ve ark. 2015). pH 6-8 aralığında ksantan gamın üretimi iyi durumda, pH'nın 5'in altına düşmesi durumunda ksantan gam üretiminin belirgin şekilde azaldığı görülmüştür (Casas ve ark. 2000).

Silva ve ark. (2009), *X. campestris* 1230 ve *X. campestris* 1182 ile peyniraltı suyundan 28°C'de 180 rpm çalkalama hızında %20 inokulum ile pH 7.2' de sırasıyla 25.42 ve 26.35 g/L verimlerinde ksantan gam elde etmişlerdir. Aljinat gamı farklı türdeki alglerin hücre duvarından ekstrakte edilen, L-guluronik asit ile D mannuronik asit içeren, biyouyumlu, mukozaya yapışabilen, biyolojik olarak parçalanabilir olan heteropolisakkarit bir gamdır (Martín ark., 2015; Wani ark., 2016; Sarao ve Arora, 2017; Albadran ark., 2018, Rehm, 2009). Aljinatlar, aljinik asit olarak da adlandırılıp, zincir boyunca blok şeklinde olmayan bir düzende olup 1,4-bağlantılı β -D mannuronik asit ve α -L-gluronik asit yapılarını içeren doğrusal bir polisakarittir (O'Sullivan ark., 2010).

Mikroenkapsülasyon işlemlerinde destek malzeme olarak kullanım özelliği, toksik bir özelliğinin bulunmaması, kolay bulunuyor ve ekonomik olması, hassas materyaller kaplanırken kalsiyum klorür ile hafif matriksler oluşturması, yüksek stabilitede jeller oluşturması, alkali tampon çözeltilerinde kolayca ortaya çıkması gibi aljinat gamının özellikleri bulunmaktadır (Gökbulut ve Öztürk, 2018; Ramani ve Ramani, 2018). Bu avantajlarının yanı sıra aljinatlar tek başlarına asitli ortama duyarlı olması, gözenekli yüzey oluşturması, çevresel durumlardan etkilenmesi, büyük çaptaki üretilere uygun olmaması gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Dordevic ark., 2015). Aljinat gamları mikroenkapsülasyon yöntemlerinden ekstrüzyon yöntemlerinde daha çok kullanılmaktadır (Martín ark., 2015).

Aljinatın kullanım alanları şu şekilde sıralanabilir:

- Tekstil alanında baskılama yapılırken desen uygulaması renk pastası alt tabakasında kullanılır.
- Gıdalarda stabilizatör, koyulaştırma ajanı, jelleştirme ajanı, emülgatör olarak kullanılır.
- Dişçilikte dolgu ve kalıp işlerinde, farmasötikte, tıbbi bileşenlerin kaplanmasında destek malzeme olarak kullanılır.

- Kozmetik alanında nem tutucu ve yoğunlaştırıcı özelliklerinden yararlanılarak kullanılır (Girgin, 2017).

Soukoulis ve ark. (2014) yaptıkları bir çalışmada *Lactobacillus rhamnosus* GG ilave ederek probiyotik özellik kazandırdıkları peynir altı suyu konsantratu ve sodyum-aljinat bazlı yenilebilir filmlerle kapladıkları unlu ürünlerde *Lactobacillus rhamnosus* GG'nin raf ömrü üzerine olan etkisini araştırmışlar ve *Lactobacillus rhamnosus* GG ilaveli filmlerle kaplanan unlu ürünlerde bayatlama önemli derecede geciktiği ve raf ömrünün uzadığı görülmüştür. Ayrıca, probiyotik bakteri ilavesinin ürünlerin tekstüründe iyileşme sağladığı da görülmüştür.

Aljinatın bağırsak mikrobiyotada fermentasyonu, bağırsak çürümesini ve kalın bağırsakta indol, H₂S ve fenol gibi toksik bileşiklerin üretimini önemli ölçüde azalttığı araştırmacılarla kanıtlanmıştır (Shang, Q. ark., 2018).

Pektin soğukta ve asitli ortamda çözülebilen iyonik stabilizör olup; gıdalarda jelleştirme, kıvam verme, emülsifiye etme, stabilite sağlama amacıyla kullanılır (Anon., 1992; Dickinson, 2003). FAO/WHO tarafından pektinin doğal katkı maddesi olarak günlük kullanım miktarına sınır getirmemektedir (Anon., 1992). TGKY'ye göre de pektin gıda katkı maddesi olarak değerlendirilmemektedir (Anon., 1977). Pektin endüstriyel olarak gıda, ilaç ve kozmetik alanlarında kullanılmaktadır (Cirimina ve ark. 2016). Jel oluşturma yeteneği molekül büyüklüğü ve metoksillenme durumuna göre değişebilmektedir (Thakur ve ark., 1997).

Pektin gamının sağlık üzerine olumlu etkileri şunlardır:

- Kanserli hücrelerin oluşumunu azaltmaktadır,
- Anti-diyare etkisi vardır,
- Mineral maddelerin absorpsiyonunu sağlamaktadır,
- Fermantasyonu sonucunda kolondaki KZYA üretimini sağlamaktadır,

- Kandaki serum glikosol ve kolestrolü azaltmaktadır,
- Kronik akciğer hastalıklarına karşı bağışıklığı güçlendirmektedir,
- Bağışıklık sistemini uyarıp kolon sağlığını korumaktadır (Wüstenberg

2014, Ho ve ark. 2017, Min ve ark. 2012, Zhang ve ark. 2018). Arioui ve ark.(2017),*Citrus sinensis* kabuğundan elde edilen pektin gamı içeren yoğurdun fiziko-kimyasal, tekstürel ve duyuşal özelliklerini 21 gün depolama süresince incelemişlerdir. Ayrıca fermentasyon süresince bakteriyel canlılık durumunu tespit etmişlerdir. *S.thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* yoğurt bakterileri ve %0, 0,1, 0,3, 0,6 oranında pektin gamı ilavesiyle üretim gerçekleştirilmiştir. %0,6 oranında pektin gamı ilavesinin, yoğurdun reolojik kalitesi olan viskozite ve yapışkanlık gibi parametrelerini önemli derecede iyileştirdiği ve serum ayrılmasını azalttığını tespit etmişlerdir. Fermentasyon sırasında ise *S. thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'un daha iyi ürediği görülmüştür. Yoğurtlarda pektin miktarının artmasıyla duyuşal olarak beğenilirliğinin de arttığı tespit edilmiştir.

Pektinin türevli bileşikleriyle prebiyotik etkisiyle ilgili çalışmalarda, *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* suşları gibi yararlı bakterileri büyümesi yönünde uyardığı, *Clostridium* gibi patojenleri ise inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca pektinin *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Clostridium* ve *Eubacterium* suşları gibi bağırsak florası bakterilerinin fermentasyonu için substrat olarak kullanıldığı tespit edilmiştir (Holck ve ark. 2014, Gómez ve ark. 2016, Chung ve ark. 2017).

Gyawali ve Ibrahim (2018), pektin ve peyniraltı suyu proteininin katkısıyla set tipi yoğurt özellikleri üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, *S. thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bakterilerini yoğurtta starter olarak kullanmış, %0,5 pektin ve %1 peyniraltı suyu proteini (WPC) ilave edilmiştir. Kontrol örneğinde *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* sayıları 7,06 ve 8,79 log¹⁰kob/g olarak bulmuşlardır. Pektin ilave edilmiş yoğurttaki *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (7,06 log¹⁰kob/g), *S. thermophilus* (8,94

\log_{10} kob/g) canlılık durumu kontrol örneğine göre daha yüksek bulunmuştur. En yüksek *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ($7,20 \log_{10}$ kob/g) ve *S. thermophilus* ($8,99 \log_{10}$ kob/g) canlılığı, pektin ve peynir altı suyuyla kombinasyonu üretilmiş yoğurtta tespit edilmiştir.

Chatterjee ve ark. (2016), laktik asit bakterilerinin, meyvelerden elde edilmiş bazı pektin matrislerinde büyüme ve gelişmesi üzerine araştırma yapmışlardır. Laktik asit kültürü olarak, *L. acidophilus*, *B.bifidum*, *L.caseisuşları*, pektin kaynağı olarak ise *Citrus limetta*, *Musa acuminata*, *Citrullus lanatus*, *Psidium guajava*, *Solanaum lycopersicum* pektinlerini kullanmıştır. Laktik asit bakterileri %0,4 oranında pektin ilave edilip MRS agarda 37°C ' de 48 saat inkübe edilmiş ve gelişmeleri 48.saat ve 60.saatte optik yoğunluk (660 nm) ölçümleriyle ölçülmüştür. 48. saatte absorbans değeri *L. casei*, *L. acidophilus*, *B.bifidum* için sırasıyla, 1, 0,8, 0,6; 60. saatte ise 0,98, 0,77, 0,56 belirlenmiştir. Pektin kullanımı laktik asit bakterilerinin gelişimini arttırmış ve en yüksek gelişme oranı, *S. lycopersicum* ve *L. caesi*' de ($2,4 \text{ OD}/660\text{nm}$) oluşmuştur. Meyvelerden elde edilen pektinin, etkili bir prebiyotik kaynağı olduğu belirtilmiştir.

Keçi boynuzu gamı "*Ceratonia siliqua*" doğal suşları tohumlarının öğütülmüş endosperminden üretilen baklagil ailesinin bir üyesidir. Asite dayanıklı, yüksek molekül ağırlığına sahip, iyonik karakterde olmayıp ılık suda çözülebilen, glikozidik bağlarla bağlı galaktopiranoz ve mannopiranoz birimlerini içeren hidrokolloidal polisakkaritlerdir (Köksel, 2005). Keçi boynuzu gamı çıplak $\beta(1-4)$ mannan segmentleri içerdiği için oda sıcaklığında az miktarda çözünmektedir. İyi bir çözünmenin olabilmesi için yaklaşık 85°C sıcaklığa ısıtmak gerekir. Keçi boynuzu gamı tek başına jelleşme özelliği göstermezken agar, karragenan veya ksantanla birlikte jelleşerek istenilen elastikiyeti sağlayıp büzülmeyi geciktirir (Köksel, 2005; Anon, 1992; Güven ve Hayaloğlu, 2001; Güven ve ark., 2003).

Yapılan bir çalışmada (Peker, 2012) keçi boynuzu gamı kullanılarak üretilen yoğurtlarda toplam kuru madde ve viskozite değerlerini kullanılan oran miktarlarınca doğru orantılı olarak arttığı tespit edilmiştir. Yoğurt üretiminde

keçiboynuzu gamı kullanımının titrasyon asitliği, pH, kurumadde ve protein değerleri üzerindeki etkisi istatistiki olarak önemli görülmüştür. Yoğurt örneklerinin su bağlama kapasite değerleri %56.59 ile %61.62 değerleri arasında değişiklik göstermiştir. Tekstürel özellikleri incelendiğinde, depolama süresince sertlik değerlerinde genellikle artış olduğu belirlenmiştir. Keçiboynuzu gamı ilavesi *Streptococcus thermophilus* sayısını etkilerken ($p<0.05$), *Lactobacillus delbrueckisubsp. bulgaricus* sayısını istatistiki açıdan etkilemediği görülmüştür ($p>0.05$). Analiz sonuçlarına göre; keçiboynuzu gamı ilavesi yoğurt örneklerinin koku, tat, görünüş, yapı ve kabul edilebilirlik değerleri üzerindeki etkisi istatistiki açıdan önemli görülmüştür ($p<0.05$).

2.2. Probiyotikler ve *Bacillus coagulans*'ın Probiyotik Olarak Önemi

Probiyotik terimi “Pro” ve “biota” diye iki kısımdan oluşup “for life” (yaşam için) anlamına gelip ilk kez 1954 yılında antibiyotik teriminin anlamca karşıtı, bazı yararlı bakterilerin yararlı etkileri şeklinde tanımlanmıştır (Coşkun, 2006). Daha sonra 1965 yılında diğer mikroorganizmaların büyümesini engelleyen mikroorganizmalar olarak isimlendirilmiştir (Lilly ve Stillwell, 1965; Markowiak ve Slizewska, 2017; Vergin, 1954). Sonraki yıllarda birçok kez tanımı değişen probiyotikler 2002 yılında FAO (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü) ve WHO (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından probiyotikleri formüle uygulandığında konağa yarar sağlayan seçilmiş mikroorganizmaların canlı suşları şeklinde tanımlanmışlardır. 2013 yılında Uluslararası Bilimsel Probiyotikler ve Prebiyotikler Derneği (ISAPP) tarafından ise probiyotikleri yeteri miktarda uygulandığında konağa yarar sağlayan seçilmiş mikroorganizmaların canlı suşları şeklinde tanımlanmışlardır (Hill ark., 2014; Markowiak ve Slizewska, 2017).

Probiyotikler, kontamine olmuş gıda ve ortamdan ileri gelen patojenik mikrobiyotanın aktivitesine karşı koyar, böylece gıda zehirlenmelerinin önüne geçmiş olurlar (Markowiak ve Slizewska, 2017). Probiyotikler antibiyotik tedavisinden sonra doğal mikrobiyotanın tekrar düzenlenmesinde önemlidirler

(Cremonini ark., 2002; Johnston ark., 2006).

Bağırsak mikrobiyotası çevresel etmenlere, beslenmeye ve hastalıklara göre değişebilen canlı, dinamik bir topluluktur (David ve ark. 2014, Kaleli 2007). Mikrobiyota ile hastalık arasında ilişkinin olduğu ilk defa 1684 yılında Anton van Leeuwenhoek tarafından ishal şikayetiyle gelen hasta ile sağlıklı bir bireyin mikrobiyotasını incelemesiyle tespit etmiştir. Daha sonra yapılan araştırmalarda beslenmenin bağırsak mikrobiyotasını doğrudan etkilediğini, kronik rahatsızlığının önlenmesi üzerinde etkisinin önemli olduğu tespit edilmiştir (Turnbaugh ve ark. 2009, de Vos ve de Vos 2012). Günümüzde en yaygın kullanım alanına sahip probiyotikler Laktobasillerdir (Gürsoy ve ark., 2005). Laktobasiller probiyotik ilavesi sütlerde, bebek mamasında ve değişik farmasötik preparatlarında probiyotik olarak tüketilmektedir (Pereira et al., 2003).

Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak isimlendirilebilmesi için çeşitli kriterleri göstermesi beklenmektedir. Söz konusu bu kriterler Laktik Asit Bakteri Endüstriyel Platformu (LABIP) tarafından belirtilmiştir (şekil 2.2.) (Cerbo ve ark, 2016).



Şekil 2.2. Probiyotik mikroorganizmalarda aranan özellikler_ (Cerbo ve ark, 2016)

Endüstrinin yaygın olduğu ülkelerde alerjik hastalıklar, atopik egzamalar, Crohn hastalığı, ülseratif kolit gibi inflamatuvar bağırsak hastalıklarının arttığı belirtilmektedir. Hastalığın nedenleri arasında immünolojik bozukluk, allerjik durumlar, bakteriler, virüsler, genetik nedenler olduğu bilinmektedir. Son yapılan çalışmalarda bu nedenlerin arasında bağırsak geçirgenliğinin fonksiyonel bozulması da yer almaktadır. Gastrointestinal sistemin (GİS) normal florasında patojen yokken, yenidoğan dönemde kazanılmakla birlikte ömür boyu sabit kalmaktadır. Annenin vajinal ve fekal florası doğum sırasında bebek tarafından yutularak bağırsak florasının kaynağını oluşturmaktadır. Doğumdan 48 saat sonra kolonda *Staphylococci*, *Streptococci*, *Enterobacteria* (10^9 - 10^{10} /g gaita) görülmektedir. İkinci ve beşinci günlerde *Bifidobacter*'ler, birinci haftanın sonunda gaita mikrobiyotasına (10^{10} - 10^{11} /g gaita) hakim olmakla birlikte, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Bacterioides* gibi patojen bakteri sayısı azalmaktadır. GİS immün sistemi bu bakteriler tarafından kullanıma hazırlanmakta ve kullanıma hazır hale gelmektedir. Probiyotikler mikrobiyel dengeyi korumakta ve patojenlerin dışkıyla atılmalarını sağlamaktadır. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların başında; *Lactobacillus rhamnosus* GG., *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* ve *Saccharomyces cerevisiae* gelmektedir. Bu mikroorganizmalardan mide-safra asitliğine karşı dayanıklı olmaları, bağırsak mikrobiyotasından izole olup, canlı olmaları, bağırsak hücrelerine adhezyon uygulayabilmeleri ve GİS'de kolonizasyon yapabilme yeteneğine sahip olmaları beklenmektedir. Antibiyotiklerleyken de etkinliklerine devam edebilmeli, olumlu etkisini bir haftadan önce gösterebilmelidir (İnanç, Şahin ve Çiçek, 2005).

Probiyotikler (örn: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*), bulunduğu konaktaki safra tuzlarından daha güçlü antibakteriyel etkiye sahip, safra asitinin türevi olan, de-konjuge safra asitlerini üretebilirler (Begley ark., 2006; Oelschlaeger, 2010).

Probiyotik suşlar bağlanma yetenekleri ile epitel hücreye yapışarak bir sinyal dalgalanmayı başlatıp, bazı çözünen bileşiklerin doğrudan ya da dolaylı (epitel hücreler aracılığıyla) olarak immünolojik hücreleri aktive ederler. Böylece

immünolojik uyarım sağlanmış olur (Markowiak ve Slizewska, 2017; Schachtsiek ark., 2004).

Probiyotikler, patojen mikroorganizmaları inhibe edebilmek için çeşitli yollar denemektedir. Bunlar: Laktik asit üretip ortamın pH'ını düşürme, hidrojen peroksit ve serbest radikaller üretme, antimikrobiyel peptid (bakteriyosin, mikrosin) üretme reseptörlere tutunup besin kaynakları için rekabet oluşturma, koruyucu mün oluşumunu uyarma, sekretuar IgA oluşumunu uyarmadır (Yılmaz, 2004).

Konakçının doğal bağırsak florasında yararlı etkisi bulunan canlı mikrobiyal gıda kaynağı olarak bilinen probiyotik mikroorganizmalar çizelge 2.2.' de verilmektedir.

Çizelge 2.2. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar (Salminen ark.,1998).

<i>Streptococcus</i> Türleri <ul style="list-style-type: none">• <i>Streptococcus cremoris</i>• <i>Streptococcus thermophilus</i>• <i>Streptococcus intermedius</i>• <i>Streptococcus lactis</i>• <i>Streptococcus diacetilactis</i>	<i>Bacteriodes</i> Türleri <ul style="list-style-type: none">• <i>Bacteriodes capillus</i>• <i>Bacteriodes suis</i>• <i>Bacteriodes ruminicola</i>• <i>Bacteriodes amylophilus</i>	<i>Enterococcus</i> Türleri <ul style="list-style-type: none">• <i>Enterococcus faecalis</i>• <i>Enterococcus faecium</i>
<i>Propionibacterium</i> Türleri <ul style="list-style-type: none">• <i>Propionibacterium shermanii</i>• <i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Küfler <ul style="list-style-type: none">• <i>Aspergillus niger</i>• <i>Aspergillus oryzae</i>	Mayalar <ul style="list-style-type: none">• <i>Saccharomyces cerevisiae</i>• <i>Saccharomyces boulradii</i>• <i>Candida torulopsis</i>

Probiyotiklerin raf ömrü 3-6 hafta kadardır. Kurutulmuş supplementlerin bir yıl içinde probiyotik özelliği azalmakta, kullanılan bakterinin düzeyine göre değişmektedir. Probiyotikler faaliyetlerini metabolize, kolonize şekilde gösterdiklerinden günlük tüketimi önerilmektedir (İnanç, Şahin ve Çiçek, 2005).

Tüketicilerin sağlık konusunda farkındalığının artmasıyla birlikte probiyotik besin içeren fonksiyonel gıdalara olan talepte artmıştır (Liong, 2007).

Probiyotiklerin yararlı etki gösterebilmesi için yapılan bir çalışmada, probiyotik organizmaların sayısının en az 10^6 kob/g olması gerektiği vurgulanmıştır. Minimum terapötik doz ise günlük 1 gramında 10^8 - 10^9 canlı hücre olmakla birlikte 100 g ürün içerisinde 10^6 - 10^7 kob/g canlı hücrenin tüketimiyle karşılanabilmektedir (Yeo ve Liang, 2010).

Bir başka çalışmada probiyotikler, sindirim sisteminde yer alan sitokinlerin antijenlere karşı antikor üreten immünokompetan hücreleri tarafından üretimini teşvik ederek sitokinlerin oluşumlarını artırabildiği vurgulanmıştır (Markowiak ve Slizewska, 2017; Marteau ve Shanahan, 2003).

Yapılan bir çalışmada *Lactobacillus reuteri* (Gu vd., 2015), *Lactobacillus plantarum* (Li, P. ve Gu, 2016), *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ve *Bifidobacterium adolescentis* (Pompei ark., 2007) gibi probiyotik mikroorganizmalar, B grubu vitaminlerinin (B1, B2, B3, B6, B8, B9, B12) doğal üretici olduğu; bu durumda immünolojik sistemin etkinliğini arttırdığı tespit edilmiştir (Nova ark., 2007). Probiyotikler vitamin ve mineral bileşiklerinin emilimini artırır (Ouwehand ark., 1999).

Mikroenkapsülasyon yönteminin probiyotik kültürler üzerine etkisini inceleyen bir çalışmada, *L. acidophilus*, *B. bifidum* ve *L. casei* kültürleri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda enkapsüle edilmiş probiyotik bakteri sayısının, enkapsüle olmayan bakteri sayısından daha yüksek seviyede olduğu görülmüştür. *B. bifidum* kültürünün $7 \log^{10}$ kob/g üzerinde kaldığı belirtilmiştir (Krasaekoopt ve ark. 2006).

Japonya'ya ait geleneksel bir gıda olan, *B. subtilis* (*natto*) kullanılarak, soya tek başına tüketimine göre soya ve bakterinin birlikte tüketilmesi daha fasulyesinin fermantasyonuyla üretilen Natto'nun potansiyel probiyotik etkisi olduğu, bakterinin fazla etki gösterdiği tespit edilmiştir (Hosoi ve ark, 2008; Cutting, 2011).

B. coagulans probiyotik olarak yer alan; Gram pozitif, fakültatif anaerobik, patojen olmayan, laktik asit üreten ve sporlu bir bakteri türüdür (Anonim, 2008).

Bacillus coagulans bakterisinin gram boyama sonrası görseli Şekil 2.3.'te verilmiştir.



Şekil 2.3. *Bacillus coagulans*'ın hücre şekli.(Anonim, 2009)

Bacillus coagulans'ın gelişim gösterdiği optimum sıcaklık 35-50 °C arasında olup, optimum pH'sı 5.5-6.5 arasında değişim göstermektedir. Asit üretmesine rağmen, sükröz, manitol, rafinoz ve maltozun fermentasyonunda gaz üretememektedir. Asit ürettiği için süt ürünlerinde, meyve ve sebzelerde bozulmalara sebep olmaktadır (Anderson, 1984; Cosentino ve ark., 1997; Ramon-Blanco ve ark., 1999; De Clerk ve ark., 2004). Bunun aksine laktik asit ve bazı suşların da termostabil alfa-amilaz gibi diğer ürünleri üretmesi nedeniyle endüstriyel yönü önem taşımaktadır (Payot ve ark., 1999; Batra ve ark., 2002; Yoon ve ark., 2002). Domateste gelişebilen, ayrıca ketçap, domates sosu ve domates çorbaları gibi gıdalarda düz ekşimeye neden olabilen *B. coagulans*, ısıya dirençli, fakültatif ve mezofilik sporlu bakteri olup, pH derecesi 4.0-4.6' nın arasında olan asitli veya asitlendirilmiş gıdalar risk grubunda yer almaktadır. Bu mikroorganizma ambalaj kutusunda şişmeye neden olmamaktadır. Bu nedenle konserve kutusu açılana kadar bozulma tespit edilememekte, bozulmuş ve

bozulmamış konserve arasındaki fark anlaşılmalıdır (Rayman Ergün ve ark., 2020).

Probiyotiklerin konakçıya yarar sağlayabilmesi için lizozime, mide asidine ve safra asidine dirençli olmaları gerekmektedir (Tuomola ve ark., 2001). Asitli gıdalarda “ekşime” şeklinde bozulmaya sebep olabilir. *Bacillus coagulans*'ın konserve meyve ve domates gibi gıdalardaki endosporları 4.1-5.0 pH aralığında çimlenebileceği gözlemlenmiştir (Ceylan ve Başbülbul, 2019).

B. coagulans'ın spor formunun dış tabakası kalın olup ısıya, kimyasallara, aside ve radyasyona karşı dirençlidir. Su veya yemle birlikte kanatlı hayvanlara verildiği takdirde uygun koşullar altında (vücut sıcaklığı, asitliği, safra ve diğer salgılarda) spor formundan aktif vejetatif hücrelere dönüşümü gerçekleşmektedir. *B. coagulans* bakterisinin spor formu termostabildir. Depolama süresince ve peletleme sırasında canlılığını koruyabilmektedir. Ayrıca spor formu, mide ve safra salgılarından etkilenmeden canlılığını koruyabilmekte ve bağırsağa ulaştığında hızlıca kolonize olabilmektedir. Sindirim sistemine yerleştikten sonra laktik asit ve diğer antogonistik maddeler üretilen patojenik bakterilerin gelişimini engeller ve bağırsakta *L. acidophilus*'un gelişimine katkıda bulunur. Ancak bağırsağın doğal mikroflorası olmadığı için *B. coagulans* sporları vücuttan yavaşça atılmaktadır. Bu nedenle *B. coagulans* probiyotik olarak kullanıldığında hayvanlara günlük olarak takviye edilmesi gerekmektedir (Anonim, 2007).

B. coagulans probiyotik olarak düzenli olarak kullanıldığında, çocukluk çağındaki diyare gibi gastrointestinal hastalıkların önlenmesinde (Hong ve ark., 2005), çocuklarda solunum yolu enfeksiyonlarının daha çabuk iyileşmesinde (Marseglia ve ark., 2007) ve hassas bağırsak sendromu gibi semptomların tedavisinde (Tompkins ve ark., 2010) etkili olduğu tespit edilmiştir.

Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, *B. coagulans* bakterisinin, bağırsakta vancomycin dirençli Enterokok yoğunluğunu azalttığını bildirmektedir (Donskey ve ark., 2001). Bazı araştırmacılar ise *B. coagulans*'ın vancomycin dirençli

Enterekokların gelişimini önleyecek uçucu olmayan maddeleri üretme yeteneğinin olmadığını bildirmektedirler (Wilson ve Perini, 1988).

İkisi ticari ve biri sığır dışkısından izole edilmiş (*B. coagulans* BCI4) üç *B. coagulans* suşlarının pH 2.5 -3.0'da canlılıklarını gösteremediklerini bildirmişlerdir (Hyronimus ve ark., 2000). Bunun aksine, *B. coagulans* CNCMI-1061 suşunun, kanatlılarda probiyotik olarak kullanıldığında, vejetatif hücrelerin canlılıklarını %50 oranında koruduğunu bulmuşlardır. Bu nedenle değişik *B. coagulans* suşlarının aside direncinin farklılık gösterdiği sonucuna ulaşmışlardır (Adami ve Cavazzoni, 1993).

Bacillus coagulans suşu olan Ganeden BC30'ı kurabiye, kek ve ekmekek gibi sekiz farklı unlu gıdalara ilave edilmiş, 4 ve 25 °C'de depolanarak suşun canlı kalma düzeyi tespit edilmeye çalışılmıştır. Ticari bir ürün olan Ganeden BC30'daki *B. coagulans* sayısı 7.3×10^8 kob/g olup, un veya yumurta sarısına karıştırma şeklinde iki farklı yolla hamurlara ilave edilerek yapılmıştır. Pişmiş ürünlerdeki probiyotik sayısının hamur halinden daha düşük olduğu ve depolama boyunca da azaldığı tespit edilmiştir. Genel olarak Ganeden BC30'un una ilave edildiği ürünlerdeki probiyotik canlı sayısı, yumurta sarısına ilave edilen probiyotik canlı sayısından daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun nedeni, yumurta sarısının protein ve diğer besin öğelerince daha zengin olması, sporların vejetatif hale daha kolay geçmesi ve vejetatif hücrelerin pişirme sırasında ölmesi olarak açıklanmıştır. Diğer bir nedense hamurların fermentasyon sırasında yine sporların vejetatif hale geçip pişirme sırasında canlılıklarını kaybetmesi olarak açıklanmıştır. Vejetatif hale geçmeyi önleyebilmek için fermentasyonu düşük sıcaklıkta ve kısa sürede yapmak gerektiği önerilmiştir (Jao ve ark., 2011).

2.3. Biyofilm Oluşumu ve *Bacillus coagulans*'ın Biyofilm Sentezleme Özelliği

Biyofilm terimi IUPAC (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği) tarafından; "mikroorganizmaların kendi ürettikleri ve hücre dışı ortama salgıladıkları polimerik bileşenlere gömülü vaziyette bir yüzeye ya da ara yüzeye

tutunmuş topluluk olarak tanımlanmıştır (Vert ark., 2012; Leone ve ark., 2006; Fujishige ve ark., 2006). Bu tanım aynı zamanda gıda, klinik, ziraat, biyoteknoloji, farmakoloji, endüstriyel/evsel su sistemlerinde, ısı değiştiricilerde, su ileten borularda, gemi karınalarında, su arıtma, depolama, işleme ve dağıtım tesislerinde karşılaşılan tüm biyofilm sistemlerini de kapsayacak şekilde tanımlama olmuştur (Vert ark. 2012, Hallam ve ark. 2001).

Biyofilmler, kronik veya dirençli bakteri infeksiyonlarından sorumlu tutulmaktadır (Costerton ark., 1999). Biyofilm ve slime terimleri birbirlerinin yerine telafuz edilmiştir (Ammendolia ark., 1999). Uygun koşullar sağlandığında bozulma etmeni olanlarla patojen özelliğe sahip tüm mikroorganizmalar tarafından biyofilm oluşumu gözlemlenebilir. Biyofilm oluşumu için ilk şart bakteriyel adezyon olmakla birlikte bakterilerin yüzeylere bağlanma düzeyi, ortamın pH'sı ve sıcaklığı, bakterinin türü, bağlandığı yüzeyin özellikleri, bakteri hücre duvarının yapısı (Gram pozitif veya Gram negatif oluşu), bakteri sayısı, hücrenin hareketliliği, ortamdaki gıdaların içeriği ve miktarı, iyon konsantrasyonu gibi birçok etmenden kaynaklı olabilir (Arnold ve Silvers, 2010; Lindsay ve ark., 2002).

Biyofilm kütlelerinin %97'lik kısmını su oluşturmaktadır. Matriks içindeki diğer bileşenler ise; %1-2 EPS, %1-2 globuler glikoproteinler ve diğer proteinler, %1-2 nükleik asit, lipit, fosfolipitler oluşturmaktadır. Bu oranlar mevcut organizmanın çeşidine, gelişme ortamının doğasına, akışkanın tipine, fizyolojik özelliğine ve genel fiziksel özelliğine göre değişiklik göstermektedir (Allison, 2003).

Biyofilmler; gıda üretim çevreleri, konakçı mikroorganizmaların mukozal yüzeyleri, insan yapımı ve doğal su sistemleri, kayaçlar, buzullar, gıda ve gıda ambalajları, damar veya üretra içi kateterler, dental yüzeyler gibi klinik alan gibi hemen hemen tüm abiyotik ya da biyotik yüzeyler üzerinde bulunabilmektedir. Biyofilm yapıları içerisindeki mikroorganizmaların planktonik karşılıklarına oranla çeşitli stres faktörüne karşı daha dayanıklı ve inatçı olmaları, klinik ve endüstriyel sahalarda sorunların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (Gupta ark. 2016).

Termofilik basiller kendi doğal sıcak su kaynaklarında yaşadıkları gibi, enerji ve turizm sektöründe kullanılan jeotermal sondaj borularında bir süre sonra ortamda bulunan organik, inorganik maddeler ve diğer mikroorganizmalarla birlikte mikrobiyal kütle şeklinde bir biyofilm tabakası meydana getirir ve boruların tıkanmasına neden olur. Böylece biyofilmler, borular içerisindeki suyun akışını yavaşlatıp boruların korozyonunu arttırabilmektedir (Flint ark. 1999, 2001a, b, Ronimus ark. 2003, Rueckert ark. 2005, Burgess ark. 2009, Somerton ark. 2015).

Biyofilmler son yıllarda yapılan çalışmalarda yoğun yüzeyler olarak bilinmekle birlikte, su ve besinlerin taşındığı kılcal damar su kanallarının bulunduğu gözenekli bir yapısının da bulunduğu tespit edilmiştir. Biyofilm yapısındaki su kanalları mikrokolonilerin hem altında hem arasında yer almaktadır. Besinlerin biyofilm tabanına taşınması bu özel kanallarla sağlanmaktadır. Hüresel atıklar biyofilmin yüzeyinde kanallarla gizlenir. Taşıma işlemi, su yardımıyla veya pasif difüzyonla gerçekleştirilir. Kolaylaştırılmış taşınma biyofilm içerisine moleküllerin yerleşmesine de yardımcı olur. Ayrıca su kanallarının, içerideki alanlara oksijen taşıdığı da tespit edilmiştir (Costerton ve ark., 1995).

Biyofilm oluşumunun kontrol edilmesi ve önlenmesinde ilk aşama, biyofilm oluşmadan gerekli tedbirlerin alınmasıdır. İşletmeler, belirli aralıklarla etkili bir temizlik işlemiyle mikroorganizmaların tutunabileceği organik maddeler ortamdan uzaklaştırılmalı ve etkili bir dezenfeksiyon işlemiyle devam etmelidir. Gıda işletmelerinde, temizlik sırasında biyofilmin uzaklaştırılması için genellikle yüzeye mekanik kuvvet uygulanmaktadır. Mekanik işlemler arasında yer alan otomatik fırçalama veya yüksek basınçla temizlik yapılması, jel temizleyicilerle veya düşük basınçla yapılan temizlikten daha etkili olduğu görülmüştür. Biyofilm oluşumunu engelleme yöntemleri arasında elektriksel alanlar, ultrason enzimler, katalize modifiye yüzeyler, deterjan maddeleri, amonyak ve formaldehit, yüksek basınçlı temizleme sistemleri daha çok yer almaktadır. Ancak her bir yöntemin

etkinliği, uygulanan yüzeye, biyofilm oluşturan bakteri türüne ve uygulama şekillerine göre farklılık göstermektedir (Meyer, 2003).

Protein, polisakkarit, DNA ve sudan oluşan ekstra-selüler matriksler biyofilm hücrelerinin tutunmasını kolaylaştırır. Yüzeye sıkıca tutunan bakteri önce burada çoğalıp mikrokolonileri oluşturur. Sonra mikrokoloniler de büyüyüp genişleyerek biyofilm tabakasını oluşturur. EPS üretimi, organizmanın yüzeye tutunması için gerekli olup biyofilm oluşumunun bir göstergesidir. Olgun bir biyofilm kütlelerinin %75–90'ını EPS'den oluşmaktadır (Padera, 2006).

Biyofilm oluşumu beş evrede gerçekleşmektedir (Post ark., 2004; Vuong ve Otto, 2002).

a. Tutunma

Biyofilm bakterilerin bir yüzeye tutunmalarıyla başlayan dinamik bir olaydır. Tutunma sonucu biyofilm fenotipinin ortaya çıkmasına neden olan bir dizi genetik işlem gerçekleştirilir. Bakterilerin bir yüzeye tutunabilmesi için, kendilerinin bir yüzey ile ne zaman temas kurduklarını anlamaları gerekmektedir. Bakteriler bu çevresel uyarıcılarla fenotipik değişiklik yaratabilmek amacıyla, bir verici ve bir alıcıdan oluşan düzenleyici bir sistem kurmaktadır. Tutunma işleminden sonra biyofilm yapma yönünde farklılaşma işleminin başlar ve “quorum sensing” sistemi denilen başka bir haberleşme sistemindeki yanıtlara bağlı olarak gerçekleşir. Bu şekilde bakteriler çevrelerindeki bakteriyel popülasyon yoğunluğunu belirlemiş olurlar. Bir yüzeye tutunan her bakteri, bulunduğu ortama mesaj veren bir molekül salgılar. Yüzeye tutunan bakterileri sayısı arttıkça, bu sinyal moleküllerinin bölgesel konsantrasyonları da artmış olur. Sinyal molekülünün konsantrasyonundaki artışla birlikte, biyofilm oluşumuyla ilgili bir dizi işlem başlatılmış olur. Biyofilm içerisinde bulunan bakteriler düşük molekül ağırlıklı, intersellüler haberciler aracılığıyla iletişimlerini oluşturmuş olurlar.

b. Yapışma

Bakterilerin bir yüzeye yapışması ya da kuvvetli bir şekilde tutunması işlemidir.

c. Toplanma

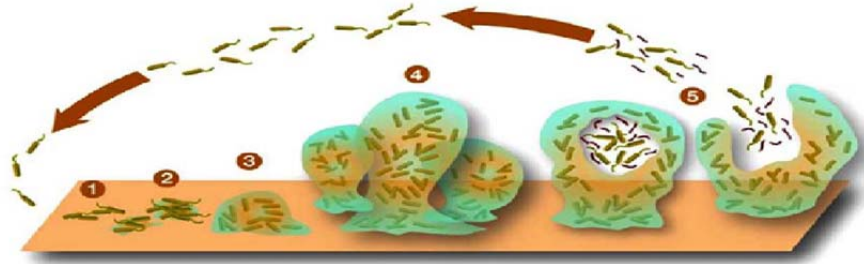
Bakterilerin mikrokoloniler halinde dönüşmesi işlemidir.

d. Olgun Biyofilm

Mikrokolonilerin büyüyüp kompleks yapıda mantar şeklindeki yapılara veya kulelere dönüşmesi işlemidir.

e. Kopma veya Ayrılma Evresi

Bakteri ya da bakteri kümelerinin biyofilm tabakasından kopup ortama yayılması işlemidir. Ayrılma işlemi biyofilm oluşum sürecinin parçası olan tek bir hücrenin veya multipl hücrelerin emboli olabileceği gibi dış kuvvetlerin etkisiyle de kopma olabilir. Stafilokoklarda biyofilm oluşum evreleri Şekil 2.4.'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Stafilokoklarda Biyofilm Oluşum Modeli (Vuong ve Otto, 2002).

Biyofilmlerin yapımı ve bakterilerin yüzeye bağlanma düzeyi, bakteri çeşidi, ortamın pH'sı ve sıcaklığı, bakteri hücre duvarı yapısı, bakteri miktarı, bağlandığı yüzeyin nitelikleri, hücre hareketliliği, ortamdaki besin öğelerinin içeriği ve sayısı veya iyon konsantrasyonu gibi pekçok faktöre bağlı olarak değişebilmektedir (Arnold ve Silver, 2000; Lindsay ve ark., 2002). Çizelge 2.3'te biyofilm oluşumunu etkileyen iç ve dış faktörlere örnekler görülmektedir (Douglas, 2003).

Çizelge 2 3. Biyofilm oluşumunu etkileyen iç ve dış faktörler (Douglas, 2003)

İÇ FAKTÖRLER	DIŞ FAKTÖRLER
Su aktivitesi (a_w)	Yüzey materyali
Besin maddelerinden yararlanma	Yüzey alanı
Antimikrobiyel madde içeriği	Yüzey düzgünlüğü
pH ve asidite	Sıvının akış hızı
Elektriksel değişkenlik ve oksijen	Sınırlı besin maddesi
Değişkeni	

Yapılan çalışmalar, biyofilmlerin sadece yüzeye tutunmuş olarak bulunan ve içinde mikroorganizmaların yer aldığı homojen bir katmandan oluşmadığı, bakterilerin belirli bir sisteme sahip ve koordinasyon kabiliyeti olan fonksiyonel topluluklardan oluşan biyolojik sistemler olduğunu göstermektedir (Davey ve ark, 2000). Yapılan çalışmalarda, biyofilmlerin sabit noktalarda biyolojik dönüşümlerini (başlangıç, olgunlaşma, muhafaza ve çözünme) tamamladıklarını tespit etmişlerdir (O'Toole ve ark., 2000).

Bu konuyla ilgili bir çalışmada mezbahalarda dekontaminasyon için kullanılan trisodyum fosfat solüsyonlarından en fazla *E. coli* O157:H7 bakterisi, daha sonra sırasıyla *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* ve *C. jejuni*' nin etkilendiği belirtilmiştir. Sonuç olarak TSP'nin; enterik mikroorganizmalar için kanatlı işleme tesislerinde oda sıcaklığında %8'lik solüsyonlarda 10 dakika boyunca uygulandığında, dekontaminasyon için ihtiyaç duyulan biosit etkiyi gösterdiği tespit edilmiştir. Aynı derişim ve sıcaklıkta *L. monocytogenes* için TSP uygulama süresinin daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu çalışmalar, karkastan akan suların bakteriyel yapışma için uygun koşullar sağlandığı taktirde soğutma boyunca karkas yüzeyinde biyofilm oluşabildiğini belirtmektedirler (Stopforth, 2000; Kreft ve Wimpenny, 2001).

Patojen gıda kaynaklı bakteri türü olan *S. aureus* ile yapılan bir çalışmada bakterinin ürettiği biyofilm gelişimi üzerine bazı bitki esansiyel yağlarının etkileri

incelenmiştir. Özellikle *Cinnamomum cassia* ve *Salvia officinalis* esansiyel yağlarının beraber kullanılmasıyla yapılan denemelerde 24 saatlik inkübasyon sonucunda *S. aureus* gelişiminin 3 log birimlik azaldığı ve biyofilm oluşumunun da 90 dakikalık muamelenin sonunda %68 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Campana ve ark, 2017).

Limon ve tarçın esansiyel yağlarıyla yapılan başka bir çalışmada *B. cereus* ve *E. coli* suşları biyofilm yapımını önleyici doğal koruyucu ajanların tespit edilmesi gıda endüstrisine olumlu katkı sağlamaktadır (Kerekes ve ark, 2013).

Nostra ve ark (2016)'nın yaptığı bir çalışmada *Punica granatum L.* ve *Rhus coriaria L.* bitki ekstraktlarının patojen olan *E. coli* ve *P. aeruginosa* tarafından oluşturulan biyofilm tabakaları sırasıyla %25-40 ve %20-30 arasında azaldığı tespit edilmiştir. Biyofilm oluşumu 96 kuyucuklu plaka yöntem ile tespit edilmiştir. Yapılan bazı çalışmalar da ultrasonik ses dalgalarının *P. aeruginosa* bakterisi tarafından oluşturulan biyofilmi parçalayabildiği görülmektedir (Masak ve ark, 2014).

Yapılan bir çalışmada et fabrikalarında temizlik ve dezenfeksiyon işlemlerini takiben gıda hatlarında bulunan konveyörlerden *Pseudomonas spp.*, *Serratia spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Listeria spp.* ve *Staphylococcus spp.* türlerinin izole edildiği belirlenmiş ve biyofilm oluşturma koşulları ile dezenfektanlara karşı dirençleri araştırılmıştır. Denemede biyofilm oluşturma kapasitesi en yüksek olan suşların dezenfeksiyon işlemlerinden sonra bile ortamdan izole edilebilen bakteriler olan *Pseudomonas*, *Acinetobacter* ve *Listeria* cinslerine ait olduğu belirlenmiştir. Bu durumun çapraz kontaminasyona neden olarak, tüketime hazır et ürünlerinde risk oluşturacağı ifade edilmektedir (Fagerlund ve ark, 2017).

Probiyotik olarak kullanılan canlı kültürlerin iki temel formu bulunmaktadır: Bunlardan ilki probiyotiklerin ısı ve neme duyarlı vejetatif formlar olması ve bu formların mide asidinden etkilenmemekte, peletleme esnasında canlılıklarını kısmen kaybedebilmektedirler. İkincisi ise, yüksek sıcaklıktan, güçlü mide asidinden, antibiyotiklerden ve depolama süresinden doğal olarak korunmuş

olan spor formu olmalarıdır. Ancak tüm faydalı mikroorganizmaların özellikle Laktik Asit Bakterileri (LAB)'nin spor formu bulunmamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar spor oluşturan ve laktik asit üreten bakteriler üzerinedir. Bu bakteriler gram pozitif olup, *Bacillus* (sporlu) ile *Lactobacillus*'un (laktik asit üreten) genel karakteristiklerini taşımaktadır (Suzuki ve Yamasato, 1994). Bu grup bakteriler içerisinde *B. coagulans* (Hammer, 1915), *B. laevolacticus*, *B. racemilacticus* (Nakayama ve Yanoshi, 1967a, b) ve *Sporolactabacillus*' a ait bakteriler yer almaktadır (Doores ve Westhoff, 1983; Holzapfel ve Botha, 1988). Bu bakteriler organik asit üretmeleri, pek çok miktarda kolayca üretilibilmeleri ve sporlu olmalarından dolayı probiyotik olarak önem taşımaktadırlar. Ayrıca bu bakteriler, spor oluşturmalarından dolayı probiyotik hayvan katkılarının üretimi aşamasında kullanılan peletleme işleminde sıcaklığa dirençli olduğu görülmektedirler (Hyronimus ve ark., 2000).

Hyronimus ve ark. (2000) yaptıkları bir çalışmada, üç *B. coagulans* suşunun (ikisi ticari ve biri sığır dışkısından izole edilmiş (*B. coagulans* BCI 4) suşlar) pH 2.5 ve 3.0 de canlılıklarını sürdüremediklerini göstermişlerdir. Bunun aksine, Adami ve Cavazzoni (1993) nin yaptığı çalışmada *B. coagulans* CNCMI-1061 suşunun, kanatlılarda probiyotik olarak kullanıldığı taktirde vejetatif hücrelerin canlılıklarını %50 oranında koruduğunu göstermişlerdir. Bu sebeple, aside direncin değişik *B. coagulans* suşlarında değişiklik gösterebileceği sonucuna varmışlardır (Adami ve Cavazzoni, 1993). Safraya dirençliliği açısından *B. coagulans* BCI 4 suşu az miktarda da olsa toleranslı bulunmasına rağmen test edilen diğer iki suş hassas olarak sınıflandırılmıştır (Hyronimus ve ark., 2000).

Probiyotikler açısından mikroorganizmaların bağırsak epitel hücrelerine tutunması kolonizasyonun ilk aşaması olmasından dolayı önemli bir kriterdir (Tuomola ve ark., 2001). Ancak in vitro çalışmaları çok fazla olmamasına rağmen bir çalışmada; domuzlarda *B. coagulans*'ın bağırsak epiteline yapışma yeteneğinin olmadığını, geçici olarak bağırsakta kaldığını ve konakçıya verildikten bir hafta sonra dışarıya atıldığını belirtmişlerdir (Adami ve Cavazzoni, 1993).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Mikroorganizmalar

Araştırmamızda, ticari olarak kullanılan probiyotik özellikteki *Bacillus coagulans* (GBI-30, 6086) suşu, keçi boynuzu (Sigma), ksantan (Sigma), pektin (FMC Biopolymer UK Ltd.) ve aljinat (FMC Biopolymer UK Ltd.) gamları kullanılmıştır.

3.1.2. Besiyerleri, Çözeltiler ve Kimyasallar

Araştırmada kullanılan besiyerlerinin özellikleri ve kullanım amaçları, Çizelge 3.1.'de verilmiştir. Seyreltme sıvısı olarak NaCl (8.5 g/L) çözeltisi hazırlanıp, 121°C'de 15 dakika otoklavlanıp sterilize edilmiştir. Basit boyamada %4'lük kristal viyole ve boyaların çözündürülmesi için %33'lük asetik asit kullanılmıştır. Petri kabı içerisindeki sterilizasyonu sağlamak için %70'lik etil alkol kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Araştırmada Kullanılan Besiyerleri

Besiyeri	Özellik	Kullanım Amacı
Nutrient Agar (NA)	Merck, Hazır besiyeri	<i>B. coagulans</i> 'ın sayımı
Nutrient Broth (NB)	Merck, Hazır besiyeri	<i>B. coagulans</i> 'ın gelişimi
Tryptic Soy Broth (TSB)	Merck, Hazır besiyeri	Keçi boynuzu, aljinat, pektin ve ksantan gamları ilavesiyle <i>B. coagulans</i> 'ın sayımı ve biyofilm özellikleri

3.2. Metod

3.2.1. *Bacillus coagulans* (GBI-30, 6086) Sayısının Belirlenmesi

Araştırmada Nutrient agar yayma ekim yöntemi kullanılarak kontrol grubu olarak *B. coagulans* (GBI-30, 6086) koloni sayısı tespit edilmiştir. Petri kaplarındaki *B. coagulans* (GBI-30, 6086) kolonilerinden öze ile alınıp NB besiyerinde 40°C’de 48 saat geliştirilen *B. coagulans* GBI-30, inkübasyon sonrasında 1mL alınarak, 10 mL’lik seyreltme sıvılarının (%0.85 lik NaCl çözeltisi) bulunduğu cam tüplerde ardışık olarak, 1/10’luk seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra seyreltilmiş bu kültürden 0.1 mL alınarak, NA besiyerinde 10⁸’e kadar ekimleri gerçekleştirilmiş. Sonrasında 40°C’de, 48 saat inkübasyona bırakılarak, sayımları yapılmıştır (Facklam ve Sahm, 1995; Baştürk, 2005).

3.2.2. Çeşitli Gamların İlavesiyle *Bacillus coagulans* (GBI-30, 6086) Sayısındaki Değişimin Belirlenmesi

Bacillus coagulans (GBI-30, 6086) yayma ekim yöntemiyle geliştirilerek gam ilave edilmeksizin kontrol grubu oluşturulmuştur. 200 mL’lik TSB besiyerlerinden ayrı ayrı %2, %3 ve %4 oranlarında çeşitli gamlar (keçi boynuzu, ksantan, pektin ve aljinat) hazırlanıp 10’ar mL’lik tüpler içerisine konulmuştur. Sonra ayrı ayrı %2.%3 ve %4 oranlarında hazırlanan gamların üzerine tek tek *Bacillus coagulans* (GBI-30, 6086) kolonilerinden ilave edilip 40⁰C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra *Bacillus coagulans* (GBI-30, 6086) suşlarını seyreltme sıvılarının (%85’lik NaCl çözeltisi) bulunduğu cam tüplerde ardışık olarak 1/10’luk seyreltme işlemi uygulanmıştır. %2, %3 ve %4 oranlarındaki her bir seyreltmeyi ayrı ayrı çeşitli gamlar (keçi boynuzu, ksantan, pektin ve aljinat) için, seyreltme işlemi sonrası, NA besiyerine 10⁸’e kadar ekimleri yapılarak, 40⁰C’de 48 saat inkübasyona bırakılıp, sayımları yapılmıştır (Fares et al., 2010).

3.2.2.1. Bazı Gamların *Bacillus coagulans* (GBI-30, 6086) Gelişimi Üzerine Etkisi

%2, %3 ve %4 oranlarında gam (Pektin, keçi boynuzu, ksantan, aljinat) 200 mL'lik

TSB besiyerlerinde hazırlama



200 mL'lik TSB çözeltilerini 10 mL'lik tüplere aktarma (ikişer tane her bir oranda)



Bacillus coagulans kültüründen öze ile alınıp 10 mL'lik TSB besiyerlerine aktarma



İnkübasyona bırakma (40 °C'de 48 saat)



10'ar mL'lik seyreltme sıvılarından hazırlama (%0.85'lik NaCl çözeltisi ile)



İnkübasyona bıraktığımız %2 ,%3 ve %4 oranlarındaki suşlardan 1 mL alınarak

1/10'luk seyreltme işlemini gerçekleştirme



%2, %3 ve %4 oranlarından 0.1 mL alınarak NA besiyerine 10⁸'e kadar ekimlerini

yapma



İnkübasyona bırakma (40 °C'de 48 saat)



Sayım yapma

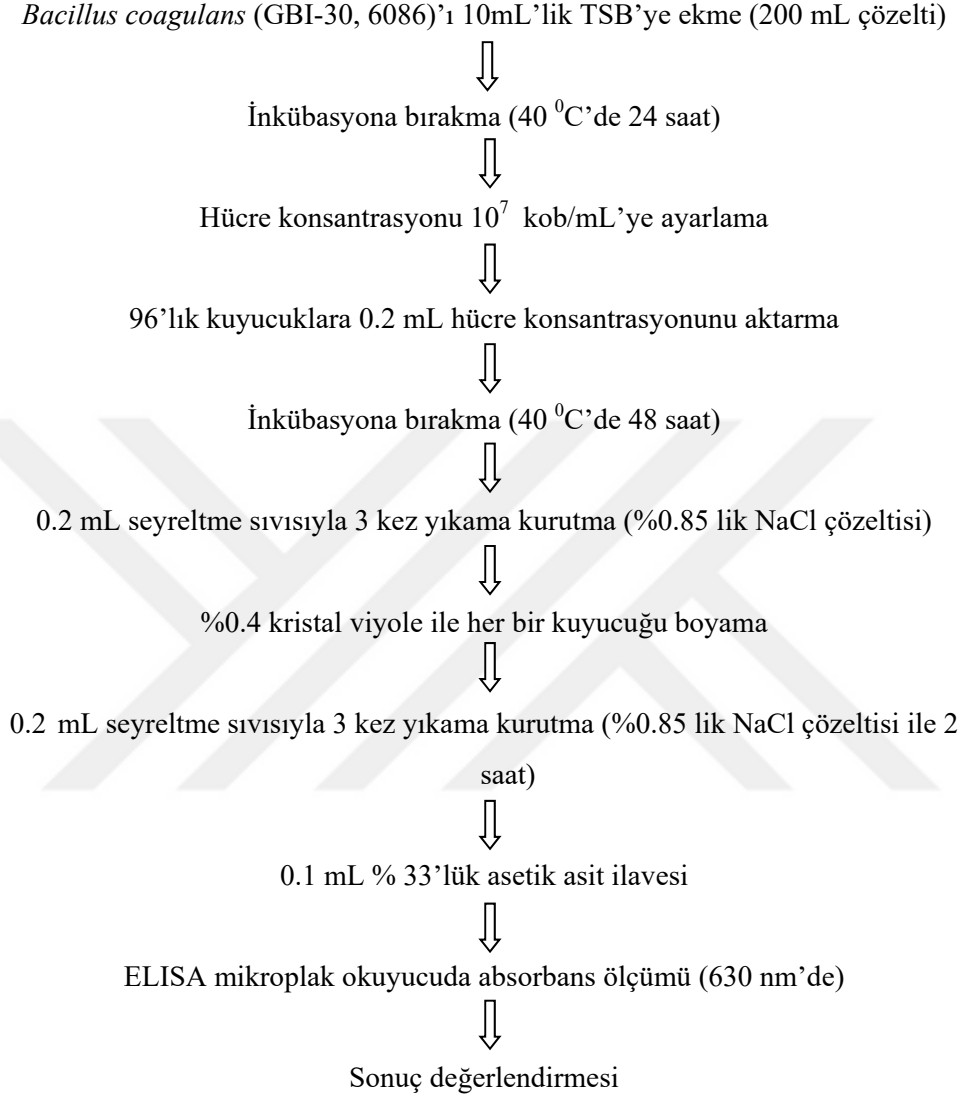
Şekil 3.1. Pektin gamının *Bacillus coagulans* (GBI-30, 6086)'a etkisinin belirlenmesi (Fares et al., 2010).

Bacillus coagulans (GBI-30, 6086) suşu üzerine farklı gamların etkisini incelediğimiz bu araştırmayı sırasıyla pektin, keçi boynuzu, ksantan ve aljinat

gamlarında uygulayarak bu gamların *Bacillus coagulans* (GBI-30, 6086) gelişimi üzerine etkileri tespit edilmiştir.

3.2.3. *Bacillus coagulans* (GBI-30, 6086)'ın Biyofilm Üretme Özelliğinin Belirlenmesi

Mikro titrasyon plak yöntemi kullanılarak kontrol grubu *Bacillus coagulans* (GBI-30, 6086)'ın 96 kuyucuklu plaklarda biyofilm elde edilmiştir. TSB besiyerine *Bacillus coagulans* (GBI-30, 6086) ekimi yapılarak 40 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bakteri konsantrasyonu 10⁷ kob/mL'ye ayarlanıp mikrotiter plaklara (96'lık kuyucuk) 200 mL eklenip 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Seyreltme sıvısı ile (%0.85 lik NaCl çözeltisi) yıkama ve kurutma işlemi yapılmıştır. Daha sonra %4'lük kristal viyole ile boyama işlemi yapıp seyreltme sıvısı (%0.85 lik NaCl çözeltisi) ile tekrar yıkama ve kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir. %33'lük asetik asitten 0.1 mL ilave edilerek 630 nm'de ELISA mikroplak okuyucudabiyofilm biyokütle ölçümü yapılmıştır (Molhoek ark., 2011).



Değerlendirme: Absorbans >0.1 = (+), Absorbans <0.1 = (-)

Şekil 3.2. *Bacillus coagulans* (GBI-30, 6086) biyofilm üretme özelliğinin belirlenmesi (Molhoek ark., 2011).

3.2.4. Çeşitli Gamların *Bacillus coagulans* Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Mikro titrasyon plak yöntemi kullanılarak *Bacillus coagulans* (GBI-30, 6086)'ın 96 kuyucuklu plaklarda kontrol grubu olarak biyofilmleri elde edilmiştir. Daha sonra %2, %3 ve %4 oranlarında alınan çeşitli gamları (keçi boynuzu ksantan, pektin ve aljinat) 200mL'lik TSB besiyerinde hazırlayarak her bir oran için (%2, %3 ve %4) 10'ar mL'lik tüplere ekimleri yapıp 40 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondaki besiyerlerinde 10^7 kob/mL olacak şekilde bakteri konsantrasyonu ayarlanmıştır. %2, %3 ve %4 oranlarında alınan gamlardan 10^7 kob/mL hücre konsantrasyonları 96'luk kuyucuklara 0.2 mL olacak şekilde aktarılıp 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Seyreltme sıvısı ile (%85'lik NaCl çözeltisi) 0.2 mL her bir kuyucuğa aktararak 3 kez yıkama ve kurutma (1 saat) işlemi yapılmıştır. %4 kristal viyole ile her bir kuyucuk boyanmıştır. Daha sonra tekrar 3 kez yıkama ve kurutma (2 saat) işlemi yapılmıştır. %33'lük asetik asitten 0.1 mL ilavesiyle 630 nm absorbans değerindeki biyofilm biyokütle ölçümü ELISA mikroplak okuyucuda yapılmıştır (Molhoek ve ark., 2011).

%2, %3 ve %4 oranlarındaki gamları 10'ar mL'lik TSB besiyerinde hazırlama (200

mL çözeltilerde)



İnkübasyona bırakma (40 °C'de 24 saat inkübasyon)



%2, %3 ve %4 oranlarındaki gamları 10⁷ kob/mL hücre konsantrasyonu olacak şekilde ayarlama



96'lık kuyucuklara hücre ekimi yapma



İnkübasyona bırakma (40 °C'de 48 saat inkübasyon)



0.2 mL seyreltme sıvısıyla 3 kez yıkama kurutma (%0.85 lik NaCl çözeltisi)



0.1 mL % 33'lük asetik asit ilavesi



ELISA mikropalak okuyucuda absorbans ölçümü (630 nm'de)



Sonuç değerlendirme

Değerlendirme: Absorbans >0.1 = (+), Absorbans <0.1 = (-)

Şekil 3.3. Çeşitli gamların *Bacillus coagulans* (GBI-30, 6086) biyofilmine tutunan hücre sayılarının belirlenmesi (Molhoek ve ark., 2011).

3.2.5. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler, varyans analiziyle değerlendirilip önemli olan değişikliklere Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmış ve bu nedenle "Windows SPSS 20.0 software" programı kullanılmıştır (Şentürk ve Özdamar, 2011).



4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Araştırmada öncelikle *Bacillus coagulans*'un koloni sayımı yapılarak, çeşitli gamların (keçi boynuzu, ksantan, pektin ve aljinat) ilavesiyle *Bacillus coagulans*'ın gelişimi üzerine etkileri incelenmiştir. Daha sonra da *Bacillus coagulans*'un biyofilm üretme özelliği ve söz konusu gamların *Bacillus coagulans* kombinasyonunda biyofilm oluşum özellikleri tespit edilmiştir.

4.1. Çeşitli Gamların İlavesinin *Bacillus coagulans* (GBI-30, 6086)' un Gelişimi Üzerine Etkisi

Gam ilavesi olmaksızın besiyerinde geliştirilen *Bacillus coagulans*'un inkübasyon sonucunda canlı hücre sayısı 7.69 ± 0.06 log kob/mL olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1.).

Ceylan ve Başbülbul (2019)'ün Toebicin 218'in gıda örneklerinde vejetatif *Bacillus coagulans* hücreleri üzerine etkisini incelediği bir çalışmada *Bacillus coagulans* DSM1 suşunun koloni sayısının tespit edildiği benzer bir çalışmada koloni sayısını 5.76 ± 0.03 log kob/mL olarak tespit edilmiştir. Yukarıda da bahsedildiği gibi çalışmadan elde edilen sonuçta kontrol grubu olan *Bacillus coagulans* 7.69 ± 0.06 bulunurken; pektin ilavesinde % 2,3 ve 4 oranlarında bakteri sayılarında sırasıyla 0.22, 1.02 ve 1.51 logaritmik birim artış olduğu görülmüştür. Ksantan ilavesinde % 2, 3 ve 4 oranlarında bakteri sayılarında sırasıyla 0.27 kob/mL 'luk azalış, 0.51 kob/mL 'luk artış ve 2.26 kob/mL 'luk artış olduğu tespit edilmiştir. Keçi boynuzu ilavesinde % 2, 3 ve 4 oranlarında bakteri sayılarında sırasıyla 0.35 kob/mL 'luk, 1.06 kob/mL 'luk ve 1.18 kob/mL 'luk artış olduğu tespit edilmiştir. Son olarak aljinat ilavesinde % 2, 3 ve 4 oranlarında bakteri sayılarında sırasıyla 0.41 kob/mL 'luk, 1.5 kob/mL 'luk ve 1.78 kob/mL 'luk artış olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre *Bacillus coagulans* ile %4 oranında elde edilen ksantan birlikteliğindeki bakteri sayısındaki (2.26 log kob/mL) artış en fazladır.

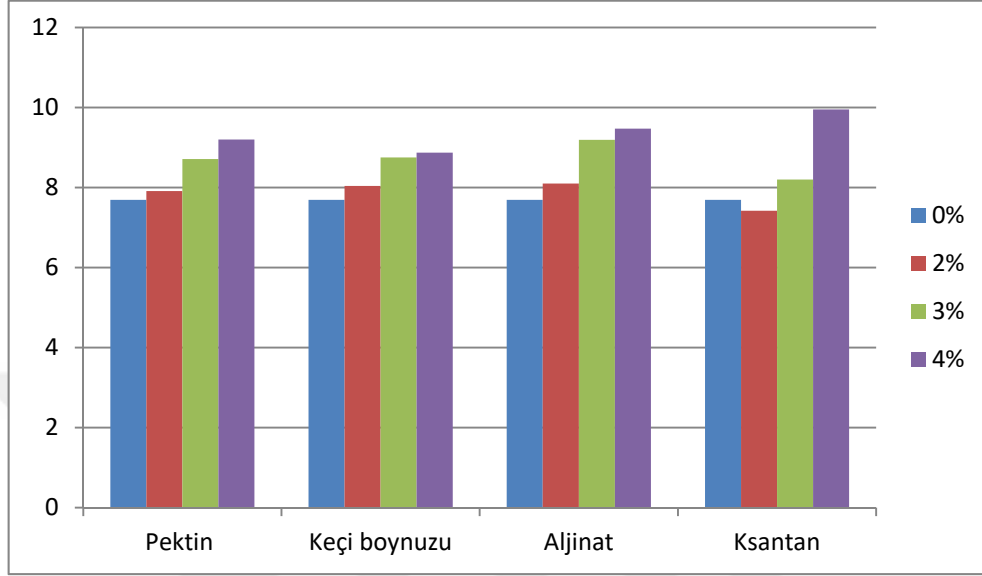
Bacillus coagulans gelişimi üzerine gamların etkisini belirlemek amacıyla ortama ilave edilen, %2, %3 ve %4 oranlarında çeşitli gamların tamamının 48. saatteki inkübasyon sonunda, *Bacillus coagulans* sayısında artışa neden olmuştur. Bu artışlar, söz konusu gamların, *Bacillus coagulans* gelişimi üzerine prebiyotik etkisinin olduğunu göstermektedir. Sayım sonuçları arasındaki sapma ve koloni sayılarındaki azalmalarda sapma istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır ($p>0.05$).

Çizelge 4.1. Farklı oranlardaki gamların *Bacillus coagulans* gelişimi üzerine etkisin (log kob/mL)

GAMLAR	%2	%3	%4
Pektin	7.91±0.28	8.71±0.11	9.20±0.94
Keçi boynuzu	8.04±0.44	8.75±0.44	8.87±0.39
Aljinat	8.10±0.08	9.19±0.61	9.47±1.01
Ksantan	7.42±0.13	8.20±0.25	9.95±0.77
Kontrol	7.69±0.06	7.69±0.06	7.69±0.06

Canlı bakteri hücre sayım sonuçları log kob/mL olarak ifade edilmektedir. ±standart sapmayı (SS) ifade etmektedir.

Canlı hücre sayısı (log kob/mL)



Gamlar

Şekil 4.1. Farklı oranlardaki gumların *Bacillus coagulans*'un gelişimi üzerine etkisinin sonucu oluşan koloni sayısındaki değişime ilişkin sonuçları

Niamah ve ark. (2016) yaptıkları bir benzer bir çalışmada, probiyotik yoğurt üretiminde akasya gamının prebiyotik olarak kullanılmasının yoğurdun fiziksel, kimyasal özellikleri ve probiyotik bakterilerin canlılığı üzerine etkisini incelemişlerdir. Yoğurt üretiminde *S. thermophilus*, *L.acidophilus* LA-5 ve *B.bifidum* Bb-12suşları ile birlikte %0.0, % 0.2, % 0.4, %0.6, %0.8 ve % 1.0 oranında gam denenmiş ve en iyi sonucu %1 oranında akasya gamı kullanımının verdiği tespit edilmiştir. Gam ilavesinin yapmış olduğumuz çalışma gibi probiyotik bakterilerin canlılığını arttırdığını ayrıca seçilen oranın probiyotiğin üzerindeki etkinliğini de göstermişlerdir.

4.2. *Bacillus coagulans*'un Biyofilm Üretme Özelliği

Mikrotitrasyon plak yöntemi kullanılarak kontrol grubu olan *Bacillus coagulans* bakterisinden biyofilm elde edilerek doğrulama testleri yapılmış ve bu testin sonucunda *Bacillus coagulans* bakterisinin biyofilm ürettiği doğrulanmıştır.

Bacillus coagulans biyofilmlerinin %4 kristal viyole ilavesiyle 630 nm'de ölçülen absorbans değeri 0.11 ± 0.00 bulunmuştur. Absorbans değerinin >0.1 olması biyofilm oluşumunu göstermektedir. Bu durumda 48 saat sonunda 630 nm'de ölçümü yapılan *Bacillus coagulans*'ın biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir.

Mikroplate yöntemi kullanarak biyofilm oluşumunun incelendiği benzer bir çalışmada Djordjevic ve ark. (2002), *L. monocytogenes*'in standardize olmuş polyvinyl klorid mikroplateri (PVC) kullanarak *L. monocytogenes* suşlarının tutunmalarını kıyaslamışlardır. Toplam 31 *L. monocytogenes* suşunu plate kuyularında bulunan Welshimer's brothta 32 °C'de 20 ve 40 saatte üretmişler ve PVC mikroplate ile suşların daha hızlı bir şekilde biyofilm oluşturduğunu bulmuşlardır.

L. innocua üzerine *B. coagulans* inokülasyonun incelendiği bir çalışmada *B. coagulans*'ın absorbans değerinin 0.073 ± 0.17 olarak tespit edip *B. coagulans*'ın absorbans değerinin >0.1 olması biyofilm oluşturduğunu benzer bir çalışmada tespit etmişlerdir (Koç ve Erginkaya, 2020).

4.3. Çeşitli Gamların *Bacillus coagulans* (GBI-30, 6086) Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisi

Araştırma sonucunda Sonuçlardan da görüldüğü üzere gam ilave edilmeksizin elde edilen biyofilm biyokütle sonuçları gam ilave edilerek elde edilen biyofilm biyokütle sonuçlarından düşük bulunmuştur. Böylece çeşitli gamların (keçi boynuzu, ksantan, pektin ve aljinat) *Bacillus coagulans* (GBI-30, 6086) biyofilm oluşumunu desteklediği ortaya çıkarılmıştır.

Belirtilen gamların, *Bacillus coagulans* (GBI-30, 6086) %4 kristal viyole ilavesiyle 630 nm'de ölçülen absorbans değerleri %2, %3 ve %4 oranlarında

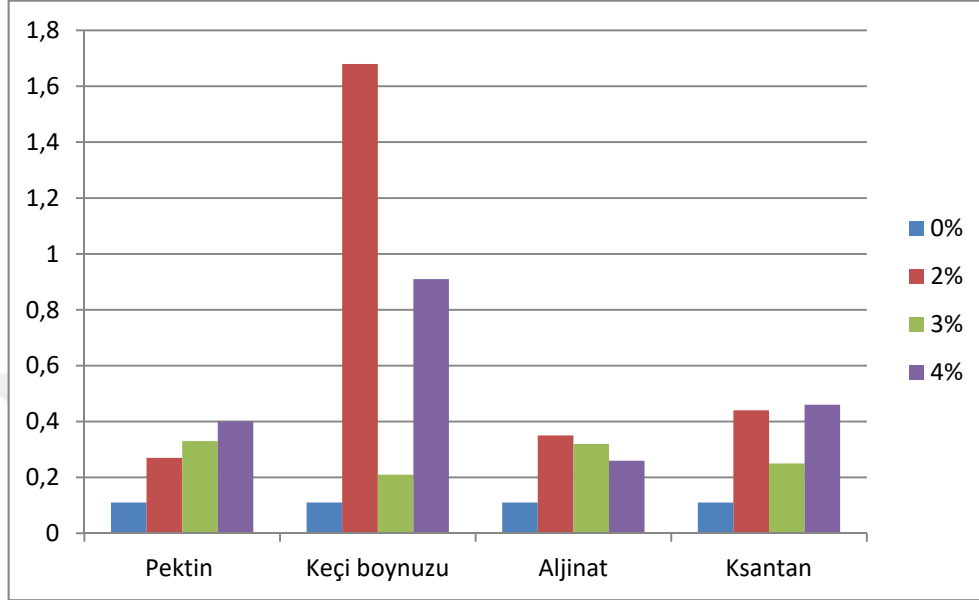
sırasıyla ksantan gamında 0.44 ± 0.39 , 0.25 ± 0.03 , 0.46 ± 0.21 ; keçi boynuzu gamında 1.68 ± 0.17 , 0.21 ± 0.00 , 0.91 ± 0.12 ; pektin gamında 0.27 ± 0.05 , 0.33 ± 0.12 , 0.40 ± 0.23 ; aljinat gamında ise 0.35 ± 0.13 , 0.35 ± 0.13 , 0.26 ± 0.05 olarak bulunmuştur. Absorbans değerlerinin >0.1 olması biyofilm oluşturduğunu göstermiştir. *Bacillus coagulans* ile keçi boynuzunun %2 oranındaki birlikteliğindeki tutunmanın en fazla olduğu görülmüştür. Biyofilmdeki bu artışı prebiyotik gamlarla probiyotik bakterilerin birlikteliğinde çeşitli antibiyotik ve patojenlere karşı koruyucu katman oluşturdular şeklinde açıklayabiliriz (Temel ve Eraç, 2018). Absorbans değerleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Çizelge 4.2. Çeşitli gamların *Bacillus coagulans* biyofilm oluşumu üzerine etkisi (Absorbans)

GAMLAR	%2	%3	%4
Pektin	0.27 ± 0.05	0.33 ± 0.12	0.40 ± 0.23
Keçi boynuzu	1.68 ± 0.17	0.21 ± 0.00	0.91 ± 0.12
Aljinat	0.35 ± 0.13	0.32 ± 0.08	0.26 ± 0.05
Ksantan	0.44 ± 0.39	0.25 ± 0.03	0.46 ± 0.21
Kontrol	0.11 ± 0.00	0.11 ± 0.00	0.11 ± 0.00

Canlı bakteri hücre sayım sonuçları log kob/mL ifade edilmektedir. \pm standart sapmayı (SS) ifade etmektedir.

Biyofilm sayımı



Gamlar

Şekil 4.2. Farklı oranlardaki gumların *Bacillus coagulans* (GBI-30, 6086)'ın biyofilm özelliklerinin değişimine ilişkin sonuçları

Yapılan benzer bir çalışmada Sudağıdan ve Aydın (2012)'nin biyokoruyucu maddelerin bakterilerin biyofilm oluşturmaları üzerine etkilerinin incelendiği çalışmada, lizozimin artan konsantrasyonlarda 4 adet *S. aureus* suşunda (EU-7B, HE-25A, SE-21A, YE-15A) biyofilm oluşumunu arttırdığını (OD = 590 nm, >0,5), bunun yanısıra lizozimin, SE-22C suşunda lizozim içermeyen besiyerine göre önce biyofilm oluşumunu azalttığı daha sonra artan konsantrasyonlarda biyofilm oluşumunu arttırdığını ortaya koymuşlardır. Lizozimin bakteri suşları gelişimi üzerine etkisi olmamasına rağmen biyofilm yapımında tetikleyici bir rolü olduğunu saptamışlardır.

Turhan ve ark. (2017) prebiyotik katkılı besiyerlerinde gelişen laktik asit bakteri suşlarının biyofilmlerinde tutunan canlı bakteri sayısı 9 – 11 log kob/ mL arasında olduğunu, biyofilme tutunan canlı hücre sayısı en düşük *L. casei*'de

görülürken (9,51 log kob/mL), en yüksek *L. rhamnosus*' da (11,37 log kob/mL) olduğunu tespit ederek prebiyotik katkılı besiyerleri ile laktik asit bakteri birlikteliklerindeki biyofilm oluşumunun değişkenlik gösterdiğini belirtmişlerdir. Yapmış olduğum benzer çalışma sonucuna göre farklı gamların *Bacillus coagulans* (GBI-30, 6086) ile oluşturduğu biyofilmlerin de değişkenlik gösterdiği görülmüştür.

Benzer bir çalışmada inülin ve oligofruktozun *L. rhamnosus GG*'nin biyofilm sentezinde destekleyici etkisi oldukları belirtilmiştir (Leeber ve ark., 2007).

Collado ve ark. (2008) yapılan çalışmaya benzer şekilde *L. rhamnosus*' un biyofilm sentezleme etkinliğinin *L. casei Shirota*' dan daha fazla olduğunu belirterek *Bacillus coagulans* (GBI-30, 6086) gibi sporlu suşların daha iyi biyofilm oluşturduğunu destekler niteliktedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada *B. coagulans*'ın nutrient agar yayma ekim yöntemiyle canlı hücre sayımı yapılmış olup *Bacillus coagulans* ile keçi boynuzu, ksantan, pektin ve aljinat prebiyotiklerinin birlikteliklerindeki hücre sayılarında 48. saatin sonunda artış olduğu tespit edilmiştir. Prebiyotik olan gamlardan ksantan gamının seçici olarak *B. Coagulans* (GBI-30, 6086) suşu ile daha aktif hale geldiği görülmektedir.

Bacillus coagulans (GBI-30, 6086) 96 kuyucuklu mikrotiter plaklar kullanılarak biyofilm üretme özellikleri incelenmiş ve biyofilm ürettikleri tespit edilmiştir. Ayrıca, probiyotik özellikteki *B. coagulans* GBI-30'ın ksantan, keçi boynuzu, pektin ve aljinat gibi prebiyotik gamlarla olan kombinasyonlarında biyofilm sentezleme özelliğinin arttığı belirlenmiştir. Özellikle keçi boynuzu gamı ile kombinasyonunda biyofilm özelliğinin daha da arttığı görülmüştür.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçla gıda katkı maddesi olan prebiyotik gamların probiyotik mikroorganizmlarla sinerjik etkisinden dolayı kullanımı ile biyofilm oluşturabilen probiyotiklerin uygun gıda katkı maddeleriyle bir araya gelmesi olumlu yönde etkilediği için gıda işletmelerinde daha sık tercih edilmesi beklenmektedir.

Bu çalışma, *Bacillus* bakterilerinin gerek süpernatant olarak ve gerekse direk kendi hücre çökeltisinin kullanılmasıyla uygulanan koruma yöntemlerine bir alternatif olabileceğini akıllara getirmiştir. Çalışma daha fazla probiyotiklerle ve prebiyotik katkı maddeleri kullanılarak genişletilmeli, biyofilmlerin doğrudan veya dolaylı olarak kullanılarak gıda güvenliği açısından doğal koruyucu madde olarak katkı sağlaması beklenmektedir.

Probiyotikler gastrointestinal enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisi amacı ile insan sağlığının tekrar oluşturulması için her geçen gün daha fazla kabul görmekte ve kullanım alanlarına sürekli yenileri eklenmektedir. Bu nedenle çalışma farklı probiyotik bakteriler ve farklı prebiyotikler kullanılarak genişletilmeli ve biyofilmlerin kullanılmasıyla gıda güvenliği açısından doğal koruyucu katkı sağlanması beklenmektedir.



KAYNAKLAR

- Abd El-Salam MH, Fadel MA, Murad HA ,1994. Bioconversion of Sugarcane Molasses into Xanthan Gum. *Journal of Biotechnology*, 33: 103-106.
- Açıkgöz, Ç. ve Z. Poyraz. 2006. Ayva Meyvesinden (*Cydonia Vulgaris Pers.*) Pektin Ekstraksiyonu ve Kimyasal Karakterizasyonu.12:1302-3055.
- Adami, A. and Cavazzoni, V., 1993. Biomass Production, Preservation and Characteristic of a Strain of *Bacillus coagulans* Usable as Probiotic. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 11: 93-100.
- Akhter, N., Wu, B., Memon, A.M., Mohsin, M. 2015.Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: a review.*Fish & Shellfish Immunology*,45(2): 733-741.
- Allison DG., 2003.The biyofilm matrix. *Biofouling*, 19 (2): 139-150.
- Anderson, R.E., 1984. Growth and Corresponding Elevation of Tomato Juice pH by *Bacillus coagulans*. *Journal of Food Science*, 49: 647-649.
- Anand, S.K., Srinivasan, R.A., Rao, L.K.,1984. Antibacterial activity associated with *Bifidobacterium bifidum*. *Cult. Dairy Prod. J.* 19, 6-8.
- Anonim,1977. Türk Gıda Kodeks Yönetmeliği. Resmi Gazete Sayı: 23172, 16 Kasım 1977, Başbakanlık Basımevi, Ankara.
- Anonim,1992. Stabilisers: properties and uses, *Dairy-Industries-International*, 57(1), 25-26.
- Anonim, 2007. Lactospore <http://www.vetcareindia.com/Ptobiotic> (erişim tarihi: 22.12.2007).
- Anonim, 2008. *Bacillus coagulans(Lactobacillus sporogenes)*–A new Generation Probiotics <http://lactospore.com/lsporo.htm>(erişim tarihi: 26.02.2009).
- Anonim,2009.The Genus *Bacillus*. <http://www.textbookofbacteriology.net/Bacillus.html> (erişim tarihi: 11.06.2009).

- Anonim,2013.Gıdalarda kullanılan kimyasallar,
<http://www.igdirsm.gov.tr/component/content/article/109-saglik/1213-hazrgdalar-da-kullanlan-kimyasallar>, (Erişim tarihi: 21.04.2013)
- Annison, G., Illman, R.J. & Topping, D.L. (2003). Acetylated, Propionylated or Butyrylated Starches Raise Large Bowel Short-Chain Fatty Acids Preferentially When Fed to Rats. *The Journal of Nutrition*, 133(11), 3523-3528.
- Ammendolia MG, Di Rosa R, Montanaro L, Arciola CR, Baldassarri L. Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylococcal clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3235–3238.
- Araujo, E.A., Carvalho, A.F., Leandro, E.S., Furtado, M.M., Moraes, C.A. 2010.Development of a symbiotic cottage cheese added with *Lactobacillus delbrueckii* UFVH2b20 and inulin. *Journal of Functional Foods*, 2(1): 85-89.
- Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L, Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2151–2156.
- Arioui, F., Ait Saada, D., Cheriguene, A. 2017. Physicochemical and sensory quality of yogurt incorporated with pectin from peel of *Citrus sinensis*. *Food Science & Nutrition*,5(2): 358-364.
- Arnold JW, Silvers S, 2000. Comparison of poultry processing equipment surfaces for susceptibility to bacterial attachment and biofilm formation, *Poul Sci*, 79: 1215-1221.
- Aşan Özüsağlam, M., 2010. Hayvan beslemede *Bacillus coagulans* bakterisinin probiyotik olarak önemi. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 5(1):50-57.
- Babbar, N., Dejonghe, W., Gatti, M., Sforza, S., Elst, K., 2016.Pectic oligosaccharides from agricultural by-products: Production, characterization and health benefits. *Critical Reviews in Biotechnology*,36(4): 594-606.

- Baurhoo, B., Letellier, A., Zhao, X. & Ruiz-Feria, C.A., 2007. Cecal Populations of Lactobacilli and Bifidobacteria and Escherichia coli Populations After In Vivo Escherichia coli Challenge in Birds Fed Diets with Purified Lignin or Mannan oligosaccharides. *Poultry Science*, 86(12), 2509-2516.
- Battle, I., and Tous, J. 1997. Carob tree *Ceratonia siliqua* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Via delle Sette Chiese 142 00145 Rome, Italy, pp 92.
- Batra, N., Singh, J., Banerjee, U.C., Patnaik, P.R. and Sobti, R.C., 2002. Production and Characterization of a Thermostable β -galactosidase from *Bacillus coagulans* RCS3. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 36: 1-6.
- Beaulieu, M., Turgeon, S.L., Doublier, J-L., 2001. Rheology, texture and microstructure of whey proteins/low methoxyl pectins mixed gels with added calcium, *International Dairy Journal*, 11, 961-967.
- Begley, M., Hill, C. & Gahan, C.G.M., 2006. Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1729-1738.
- Ben Salah, R., Chaari, K., Besbes, S., Ktari, N., Blecker, C., Deroanne, C., Attia, H. (2010). "Optimisation of xanthan gum production by palm date (*Phoenix dactylifera* L.) juice byproducts using response surface methodology" *Food Chemistry*, 121, 627–633.
- Berner L., O'Donnell J., 1998. Functional foods and health claims legislation: Applications to dairy foods. *Int. Dairy J.*, 8, 355--362.
- Brunser, O., Gotteland, M., 2010. Probiotics and prebiotics in human health: Bioactive foods in promoting health, Ed.: Watson, R., Preedy, V., pp: 73-93.
- Bondi, M., Messi, P., Danila, I. and Marchioretto, D.I. 2000. Biological Characteristics of LABLYS98, a *Lactobacillus sporogenes* for Use as a Probiotic Compound. *Industrie Alimentari*, 39:704-710.

- Burey, P., Bhandari, B.R., Howes, T. ve Gidley, M.J., 2008. Hydrocolloid gel particles: formation, characterization, and application. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48: 361-377.
- Burgess, S.A., Brooks, J.D., Rakonjac, J., Walker, K.M. and Flint, S.H. 2009. The formation of spores in biofilms of *Anoxybacillus flavithermus*. *Journal of Applied Microbiology*, 107(3); 1012-1018.
- Campana, R., Casettari, L., Fagioli, L., Cespi, M., Bonacucina, G., Baffone, W., 2017. Activity of essential oil-based microemulsions against *Staphylococcus aureus* biofilms developed on stainless steel surface in different culture media and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 241:132–140.
- Casas, J.A., Santos, V.E., Garcia-Ochoa, F. (2000). "Xanthan gum production under several operational conditions: Molecular structure and rheological properties." *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 282–290.
- Cerbo A, Palmieri B, Aponte M, Medina J.C.M, Lannitti T. Mechanisms and therapeutic effectiveness of *Lactobacillus*. *Journal of Clinical Pathology* 2016, 69, 187–203.
- Ceylan, A. A., Başbülbul, G., Biyoloji Bölümü, A., Rekombinant, D. N. A., Merkezi, R. P., & Redprom, A., 2019. *Geobacillus toebii* HBB-218 Tarafından Üretilen Bakteriyosinin Konserve Gıdalarda *Bacillus coagulans* ve *Geobacillus stearothermophilus*'u Engellemek Amacıyla Uygulanması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti*, 140.
- Chandan R., 1997. Dairy--based ingredients. *American Association of Cereal Chemists*, St.Paul, MN. pp. 96-99.
- Chatterjee, E., Manuel, G.A.S., Hassan, S. 2016. Effect of fruit pectin on growth of lactic acid bacteria. *Journal of Probiotics and Health*, 2: 147-150.
- Chung, W.S.F., Walker, A.W., Louis, P., Parkhill, J., Vermeiren, J., Bosscher, D., Duncan, S.H., Flint, H.J. 2016. Modulation of the human gut microbiota by dietary fibres occurs at the species level. *BMC Biology*, 14(1): 3.

- Chung, W.S.F., Meijerink, M., Zeuner, B., Holck, J., Louis, P., Meyer, A.S., Wells, J.M., Flint, H.J., Duncan, S.H., 2017. Prebiotic potential of pectin and pectic oligosaccharides to promote anti-inflammatory commensal bacteria in the human colon. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(11): 127.
- Cho, H.M., Yoo, B., 2015. Rheological characteristics of cold thickened beverages containing xanthan gum-based food thickeners used for dysphagia diets. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 115(1): 106–111.
- Ciriminna, R., Chavarría-Hernández, N., Inés Rodríguez Hernández, A., Pagliaro, M. 2015. Pectin: A new perspective from the biorefinery standpoint. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 9(4): 368-377.
- Ciriminna, R., Fidalgo, A., Delisi, R., Ilharco, L. M., Pagliaro, M. 2016. Pectin production and global market. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 27(5): 17-20.
- Collado MC, Meriluoto J, Salminen S. 2008. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *Eur Food Res Technol.*, 226: 1065–1073. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-007-0632-x>.
- Collins, B.E., Hardt, P., 1980. Inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* 63, 830-832.
- Cosentino, S., Mulargia, A.E., Pisano, B., Tuveri, P. and Palmas, E. 1997. Incidence and Biochemical Characteristics of Bacillus Flora in M.AŞAN ÖZÜSAĞLAM 56 Sardinian Dairy Products. *Int. J. Food Microbiol.*, 97:147-156.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. 1995. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 49: 711-745.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 5427–5433.
- Cremonini, F., Di Caro, S., Nista, E.C., Bartolozzi, F., Capelli, G., Gasbarrini, G. & Gasbarrini, A. , 2002. Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhoea. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 16(8), 1461-1467.

- Crittenden, R., Laitila, A., Forssell, P., Mattö, J., Saarela, M., Sandholm, M. T. and Myllarinen, P. ,2001. Adhesion of bifidobacteria to granular starch and its implications in probiotic technologies. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(8): 3469-3475.
- Cruz, A.G.D., Cavalcanti, R. N., Guerreiro, L. M. R., Sant'Ana, A.D.S., Nogueira, L.C., Oliveira, C.A.F.D., Delizae, R., Cunha, R.L., Fariaa, J.A.F.,Bolini, H.M.A. 2013.Developing a prebiotic yogurt: Rheological, physico-chemical and microbiological aspects and adequacy of survival analysis methodology.*Journal of Food Engineering*,114(3): 323-330.
- Cutting, S. M., 2002. *Bacillus* probiotics; spore germination in the gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:2344-2352.
- Çiftçi Z., 2005. Kronik tonsillitte biofilmin rolü, T.C. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi KBB Kliniği, Uzmanlık Tezi, 69 sayfa, Basılmamıştır.
- D'Aimmo, M.R., Modesto, M., Biavati, B., 2007. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. Isolated from dairy and pharmaceutical products. *International Journal of Food Microbiology*, 115(1): 35-42.
- Davey, M.E., O'toole, G.A., 2000. Microbial biofilms from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64:847-867.
- David, L.A., Maurice, C.F., Carmody, R. N., Gootenberg, D.B., Button, J.E., Wolfe, B.E., Ling, A.V., Devlin, A.S., Varma, Y., Fischbach, M.A., Biddinger, S.B., Dutton, R.J., Turnbaugh, P.J., 2014. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome.*Nature*,50 (7484): 559.
- De Clerk, E., Rodriguez-Diaz, M., Forsth, G., Lebbe, L., Logan, N.A. and De Vos, P. 2004. Polyphasic Characterization of *Bacillus coagulans* Strains, Illustrating Heterogeneity within this Species, and Emended Description of the Species. *Syst. Appl. Microbiol.*, 27: 50-60.

- De Morais, E.C. 2016. Prebiotic addition in dairy products: processing and health benefits: Probiotics, prebiotics, and synbiotics-bioactive foods in health promotion, Ed.: Ronald Watson, R., Preedy, V., Elsevier, Amsterdam, 938 pp.
- Demirci, M. 2006. Karbonhidratlar. s: 48-50, Gıda Kimyası, Rebel Yayıncılık, Tekirdağ.
- Demirtaş, Ö., 2007. Keçiboynuzu (*Ceratonia Siliqua*) çekirdeklerinden gam üretim yollarının araştırılması. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana.
- De Vos, W.M., De Vos, E.A. 2012. Role of the intestinal microbiome in health and disease: from correlation to causation. *Nutrition reviews*, 70(1): 45-56.
- Dickinson, E., 2003. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems, *Food Hydrocolloids*, 17, 25-39.
- Djordjevic, D., Wiedmann, M., McLandsborough, L.A., 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:2950-2958.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 167-193.
- Donskey, C.J., Hoyen, C.K., Das, S.M., Farmer, S., Dery, M. and Bonomo, R.A. 2001. Effect of Oral *Bacillus coagulans* Administration on the Density of Vancomycin-Resistant Enterococci in the Stool of Colonized Mice. *Lett. Appl. Microbiol.*, 33: 84-88.
- Doores, S. and Westhoff, D.C. 1983. Selective Method for the Isolation of *Sporolactobacillus* from Food and Environmental Samples. *J. Appl. Bacteriol.*, 54: 273-280.
- Douglas, L.J., 2003. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*, 11:30-36.
- EFSA, 2013. Scientific Opinion On The Maintenance Of The List Of QPS Biological Agents Intentionally Added To Food and Feed (2013 update). 11(11):3449.

- El-Salam A., Fadel, M.A., Murad, H.A., (1994). "Bioconversion of sugarcane molasses into xanthan gum." *Journal of Biotechnology*, 33, 103–106.
- Endres, J. R., Clewell, A., Jade, K. A., Farber, T., Hauswirth, J., Schauss, A. G., 2009. Safety assessment of a proprietary preparation of a novel probiotic, *Bacillus coagulans*, as a food ingredient. *Food and Chemical Toxicology* 47:1231–1238.
- Everard, A., Cani, P.D.(2013). Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 27(1), 73-83.
- Fagerlund, A., Moretro, T., Heir, E., Briandet, R., Langsrud, S., 2017. Cleaning and disinfection of biofilms composed of *Listeria monocytogenes* and background microbiota from meat processing surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(17):1-21.
- Fares, C., Menga, V., Martina, A., Pellegrini, N., Scazzina, F., & Torriani, S., 2015. Nutritional profile and cooking quality of a new functional pasta naturally enriched in phenolic acids, added with β -glucan and *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086. *Journal of Cereal Science*, 65, 260-266.
- Farhadi, G.B., Khosravi-Darani, K., Nasernejad, B., 2012. Enhancement of xanthan production on date extract using response surface methodology. *Asian Journal of Chemistry*, 24.
- Faria, S., de Oliveira Petkowicz, C. L., de Moraes, S. A. L., Terrones, M. G. H., de Resende, M. M., de Franca, F. P., & Cardoso, V. L. ,2011. "Characterization of xanthan gum produced from sugar cane broth" *Carbohydrate Polymers*, 86, 469-476.
- Flint, S.H., Ward, L.J. and Brooks, J.D. 1999. *Streptococcus waius* sp.nov., a thermophilic streptococcus from a biofilm. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(2); 759-767.
- Flint, S.H., Palmer, J., Bloemen, K., Brooks, J. and Crawford, R. 2001a. The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*, 90(2); 151-157.

- Flint, S., Palmer, J., Bloemen, K., Brooks, J. and Crawford, R. 2001b. The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*, 90(2); 151-157.
- Fujishige NA, Kapadia NN, Hirsch AM. 2006. A fee-ling for the microorganism: structure on a small scale. *Biofilms on plant roots. Bot J Linnean Soc*, 150 (1): 79-88.
- Garcia-Ochoa F, Santos VE, Casas JA, Gomez E (2000). Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*, 18: 549-579.
- Gencer, G., 1988. Teknolojik toksikolojik ve yasal açıdan gıda katkıları "Gamlar". T.C Sanayi ve Ticaret Bakanlığı Smaı Eğitim ve Geliştirme Merkezi Genel Müdürlüğü, 12, 12-16.
- Gibson G R, Roberfroid M. B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota. Introducing the concept of prebiotics, *journal of nutrition*, 125: 1401-1412.
- Gibson, G.R., Roberfroid, M.B., 2008. *Handbook of Prebiotics*, CRC Press, Boca Raton, USA, 475 pp.
- Gill, H.S., Guarner, F. 2004. Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgraduate Medical Journal*, 80(947): 516-526.
- Girgin, B. ,2017. Melatonin yüklü aljinat/gam arabik kürelerin üretimi ve ilaç salım özelliklerinin araştırılması (Master's thesis, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Godshall, M.A. 1997. How carbohydrates influence food flavor. *J. Food Technol.* (51), 63–67.
- Güven, M. ve Hayaloğlu, A.A.,2001. Hidrokolloidler ve süt teknolojisinde kullanımları, *Gıda*, 7, 72-79.
- Jan, G., Leverrier, P., Proudly, I. ve Roland, N., 2002. Survival and beneficial effects of propionic bacteria in the human gut: in vivo and in vitro investigations. *Lait*, 82: 131-144.

- Gómez, B., Yáñez, R., Parajó, J.C., Alonso, J.L. 2016. Production of pectin-derived oligosaccharides from lemon peels by extraction, enzymatic hydrolysis and membrane filtration. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 91(1): 234-247.
- Grassino, A.N., Barba, F.J., Brnčić, M., Lorenzo, J.M., Lucini, L., Brnčić, S.R. 2018. Analytical tools used for the identification and quantification of pectin extracted from plant food matrices, wastes and by-products: A review. *Food Chemistry*, 266: 47-55.
- Gu, Q., Zhang, C., Song, D., Li, P. & Zhu, X., 2015. Enhancing vitamin B12 content in soy-yogurt by *Lactobacillus reuteri*. *International Journal of Food Microbiology*, 206, 56-59.
- Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S. and Tribedi, P. 2016. Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Archives of Microbiology*, 198(1); 1-15.
- Gün, İ., & Ekinci, F. Y., 2009. Biyofilmler: Yüzeylerdeki Mikrobiyal Yaşam. *Gıda/The Journal Of Food*, 34(3).
- Gürsoy, O., Kınık, Ö. ve Gönen, İ.(2005). Probiyotikler ve Gastrointestinal Sağlığa Etkileri. *Türk Mikrobiyol Cem Dergisi*. 35: 136-148.
- Güven, M. ve Hayaloğlu, A.A., 2001. Hidrokolloidler ve süt teknolojisinde kullanımları, *Gıda*, 7, 72-79.
- Güven, M., Karaca, O.B., Kaçar, A., Hayaloğlu, A.A. ve Yaşar, K., 2003. Kahramanmaraş tipi dondurma üretiminde salebe alternatif stabilizer olarak keçi boynuzu sakızının kullanım olanakları, *Gıda Teknolojisi*, 2, 41-48.
- Gyawali R., Ibrahim, S. 2018. Addition of pectin and whey protein concentrate minimises the generation of acid whey in Greek-style yogurt. *Journal of Dairy Research*, 85: 238-242.
- Hallam NB, West, JR, Forster, CF, Simms J., 2001. The potential for biofilm growth in water distribution systems *Wat Res*, 35: 4063-4071.

- Hammer, B.W. 1915. Bacteriological Studies on the Coagulation of Evaporated Milk. Iowa Agric. Exp. States Res. Bull., 19: 119-131.
- Harholt, J., A. Suttangkakul and H. V. Scheller. , 2010. Biosynthesis of Pectin. Plant Physiology. 153; 384–395.
- Harman, M. and K nol, J. , 2006. Q uantitative real- time pc r a na lys is o f fecal lactobacillus species in infants receiving a prebiotic infant formula. Applied and Environmental Microbiology. 72(4): 2359-2365.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C. & Sanders, M.E. , 2014. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 11(8), 506-514.
- Hollingworth, C.S., 2010. Food Hydrocolloids: Characteristics, Properties and Structures. Nova Science Publishers, New York.
- Ho, Y.Y., Lin, C.M., Wu, M.C. 2017. Evaluation of the prebiotic effects of citrus pectin hydrolysate. Journal of Food and Drug Analysis, 25(3): 550-558.
- Holck, J., Hotchkiss Jr, A.T., Meyer, A.S., Mikkelsen, J.D., Rastall, R.A. 2014. Production and bioactivity of pectic oligosaccharides from fruit and vegetable biomass. Food oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity, 5: 76-87.
- Holzappel, W.H. and Botha, S.J. 1988. Physiology of Sporolactobacillus Strains Isolated from Different Habitats and the Indication of in Vitro Antagonism against Bacillus sp.. Int. J. Food Microbiol., 7: 161-168.
- Holzappel WH., Schillinger U., 2002. Introduction to pre- and probiotics. Food Res. Int., 35, 109--116.
- Hong, H.A., Duc, L.H., Cutting, S.M., 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. FEMS Microbiology Reviews, 29: 813-835.

- Hosoi, T., Kiuchi, K., 2008. Natto: A soybean food made by fermenting cooked soybeans with *Bacillus subtilis* (natto). In: Handbook of Fermented Functional Foods. Farnworth ER. (chief edition), CRC Press, Boca Raton, p.267-290.
- Hyronimus, B., Le Marrec, C., Sassi, A. H., Deschamps, A., 2000. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 61:193–197.
- İlkgül, Ö. , 2005. Modern tıpta prebiyotikler ve probiyotikler. *Turkish Journal of Surgery*, 21(1), 047-050.
- İnanç, N., Şahin, H. ve Çiçek, B. , 2005. Probiyotik ve prebiyotiklerin sağlık üzerine etkileri. *Erciyes Tıp Dergisi (Erciyes Medical Journal)* 27(3)122-127.
- Jao, C.L., Huang, S.L., Wu, S.C., Kuo-Chiang, H., 2011. The study on SFLAB GanedenBC30 viability on baking products during storage. 11th International Congress on Engineering and Food (ICEF11), *Procedia Food Sci* 1: 1601-1609, doi: 10.1016/j.profoo.2011.09.237.
- Johnston, B.C., Supina, A.L. & Vohra, S. (2006). Probiotics for pediatric antibiotic-associated diarrhea: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, 175(4), 377-383.
- Kalantzopoulos G., 1997. Fermented products with probiotics qualities. *Anaerobe*, 3, 185--190.
- Kaleli, İ., 2007. Probiyotiklerin Etki Mekanizması. *Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği Dergisi*. 21 (Ek 2): 238- 242.
- Kalogiannis, S., Gesthimani, I., Maria, L.K., Dimitrios, A.K., George, N.S. (2003). "Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses." *Process Biochemistry* 9, 249–256.
- Kandil, M., Ersan, L., Özcan, T., Bayazit, A., 2017. Gamların probiyotik özellikleri. *Gıda ve Yem Bilimi Dergisi*, (18):19-20.

- Kandil, M., 2019. Bazı probiyotik bakterilerin gelişmesi üzerine ksantan gamin etkisi (Master's thesis, Bursa Uludağ Üniversitesi).
- Karabıyıklı, Ş., & Donat, İ., 2019. Prebiyotik Diyet Liflerinin Kolon Mikrobiyatası ve Sağlık Üzerine Etkileri. *Journal of New Results in Engineering and Natural Sciences*, (10), 1-15.
- Karaman, S., Özcan, T., 2018. Fonksiyonel süt ürünlerinin geliştirilmesinde nutrasötik bileşenler. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, 20: 30-45.
- Karri, S.K., Majeed, M., Natarajan, S., Sivakumar, A., Ali, F., Pande, A., Majeed, S., 2016. Evaluation of anti-diarrhoeal activity of *Bacillus coagulans* MTCC 5856 and its effect on gastrointestinal motility in wistar rats. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 7(1):311-316.
- Katia, S., Villarreal, M. M. L., M.I., S. S., Tallarico, A.M.A., Kimiko, S.I. & Rossi, E.A., 2014. Prebiotic Effect of Fructooligosaccharide in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME® Model). *Journal of Medicinal Food*, 17(8), 894-901.
- Kennedy JF, Bradshaw IJ., 1984. Production, properties and applications of xanthan. *Prog Ind Microbiol*, 19: 319-71.
- Kerekes, E.B., Deak, E., Tako, M., Tserennadmid, R., Petkovits, T., Vagvölgyi, C., Krisch, J., 2013. Antibiofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related microorganisms. *Journal of Applied Microbiology*, 115:933-942.
- Kim, S.G., Yoo, W., Yoo, B., 2014a. Effect of thickener type on the rheological properties of hot thickened soups suitable for elderly people with swallowing difficulty. *Preventive Nutrition and Food Science*, 19(4): 358–362.
- Kim, S.G., Yoo, W., Yoo, B., 2014b. Relationship between apparent viscosity and line spread test measurement of thickened fruit juice prepared with a xanthan gum based thickener. *Preventive Nutrition and Food Science*, 19(3): 242–245.

- Knopp, R.H., Superko, H.R., Davidson, M., Insull, W., Dujovne, C.A., Kwiterovich, P.O. ve Edelman, D.A., 1999. Long-term blood cholesterol-lowering effects of a dietary fiber supplement. *American Journal of Preventive Medicine*, 17(1): 18-23.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H., C. 2006. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated aljinate beads in yoghurt from UHT-and conventionally treated milk during storage. *LWT-Food Science and Technology*, 39(2): 177-183.
- Kreft, J.U., Wimpenny, J.W.T., 2001. Effect of EPS on biofilm structure and function as revealed by an individual-based model of biofilm growth. *Water Science and Technology*, 43:135-141.
- Koç, G., & Erginkaya, Z., 2020. Probiyotik bacillus coagulans' in antilisterial ve antibiyofilm özelliklerinin belirlenmesi. *Ç.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 39(5).
- Kolter R, Tormo A., 1993. The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 855 – 874.
- Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., 2008. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106:381-386.
- Kumar, C.G., Anand, S.K., 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review”, *International Journal of Food Microbiology*, 42: 9-27.
- Köksel, H., 2005. Karbonhidratlar. *Gıda Kimyası* (Ed. Saldamlı, Ğ). Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 49-132.
- Lebeer, S., Verhoeven, L. A., Velez, M., Vanderleyden, J., Keersmaecker, S., 2007. Impact of Environmental and Genetic Factors on Biofilm Formation by the Probiotic Strain *Lactobacillus rhamnosus* GG, 6770-6774.
- Leone S, Molinaro A, Alfieri F, Cafaro V, Lanzetta R, Donato A, Parrilli M., 2006. The biofilm matrix of *Pseudomonas* sp. OX1 grown on phenol is mainly constituted by aljinate oligosaccharides. *Carbohydr Res*, 341: 2456 – 2461.

- Lilly, D. M. & Stillwell, R.H. ,1965. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science*, 147(3659), 747-748.
- Lindsay D, Brözel VS, Mostert JF, Von Holy A., 2002. Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy-associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate *J Appl Microbiol* 92: 352 – 361.
- Liong, M.T., 2007. Probiotics: a critical review of their potential role as antihypertensives, immune modulators, hypo-cholesterolemic, and perimenopausal treatments. *Nutrition Reviews*, 65(7), 316-328.
- Li, P. & Gu, Q. ,2016. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* LZ95, a potential probiotic strain producing bacteriocins and B-group vitamin riboflavin. *Journal of Biotechnology*, 229, 1-2.
- Lisoba, M.P., Bonatto, D., Bizani, J.A., Henriques, Brandelli, A., 2006. Characterization of a bacteriocin like substance produced by *Bacillus amyloliquifaciens* isolated from Brazilian atlantic forest. *International Microbiology*, 9:111-118.
- Marcotte, M., Hoshahili, A.R.T., ve Ramaswamy, H.S.,2001. Rheological properties of selected hydrocolloid as a function of concentration and temperature, *Food Research International*,34, 695-703.
- Maric, M., Grassino, A.N., Zhu, Z., Barba, F.J., Brnčić, M. Rimac Brnčić, S., 2018. An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and byproducts: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction. *Trends Food Science Technology*, 76: 28-37.
- Markowiak, P. & Slizewska, K.,2017. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, 9(9).
- Marteau, P. & Shanahan, F. ,2003. Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17(5), 725-740.

- Marseglia, G.L., Tosca, M., Cirillo, I., Licari, A., Leone, M., Marseglia, A., Castellazzi, A.M., Ciprandi, G., 2007. Efficacy of *Bacillus clausii* spores in the prevention of recurrent respiratory infections in children: a pilot study. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 3:13-17.
- Masak, J., Cejkova, A., Schreiberova, O., Rezanka, T., 2014. *Pseudomonas* biofilms possibilities of their control. *FEMS Microbiology Ecology*, 89:1–14.
- Mayer, E.A. (2011). Gut feelings: the emerging biology of gut-brain communication. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(8), 453-466.
- Meyer B., 2003. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *Int. Biodeterioration Biodegrad*, 51: 249 – 253.
- Milani, J., & Maleki, G. (2012). Hydrocolloids in food industry. *Food industrial processes—Methods and equipment*, 2, 2-37.
- Min, Y.W., Park, S. U., Jang, Y.S., Kim, Y.H., Rhee, P.L., Ko, S.H., Joo, N., Kim, S.I., Kim, C.H., Chang, D.K. , 2012. Effect of composite yogurt enriched with acacia fiber and *Bifidobacterium lactis*. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 18(33): 4563-4569.
- Molhoek, E. M., van Dijk, A., Veldhuizen, E. J., Haagsman, H. P., & Bikker, F. J. , 2011. A cathelicidin-2-derived peptide effectively impairs *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *International journal of antimicrobial agents*, 37(5), 476-479.
- Nakayama, O. and Yanoshi, M. 1967a. Spore Bearing Lactic Acid Bacteria Isolated from Rhizosphere. I. Taxonomic Studies on *Bacillus laevolacticus* nov. sp. and *Bacillus racemilacticus* nov. sp. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 13: 139-153.
- Naranjo, J. M., Posada, J. A., Higuera, J. C., Cardona, C. A., 2013. Valorization of glycerol through the production of biopolymers. The PHB case using *Bacillus megaterium*. *Bioresource Technology*, 133:38–44.

- Niamah, A.K., Al-Sahlany, S.T.G., Al-Manhel, A.J. 2016. Gum arabic uses as prebiotic in yogurt production and study effects on physical, chemical properties and survivability of probiotic bacteria during cold storage. *World Applied Sciences Journal*,34(9): 1190-1196.
- Niknezhad, S.V., Asadollahi, M.A., Zamani, A., Biria, D., 2016. "Production of xanthan gum by free and immobilized cells of *Xanthomonas campestris* and *Xanthomonas pelargonii*" *International Journal of Biological Macromolecules*. 82, 751-756.
- Nostro, A., Guerrini, A., Marino, A., Tacchini, M., Di Giulio, M., Grandini, A., Akin, M., Cellini, L., Bisignano, G., Saraçoğlu, H.T., 2016. In vitro activity of plant extracts against biofilm-producing food-related bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 238:33–39.
- Nova, E., Wärnberg, J., Gómez-Martínez, S., Díaz, L.E., Romeo, J. & Marcos, A., 2007. Immunomodulatory effects of probiotics in different stages of life. *British Journal of Nutrition*, 98(S1), S90-S95.
- Oelschlaeger, T. A., 2010. Mechanisms of probiotic actions –A review. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(1), 57-62.
- Oflaherty, S., Klaenhammer, T.R., 2010. The role and potential of probiotic bacteria in the gut, and the communication between gut microflora and gut/host. *International Dairy Journal*, 20(4): 262-268.
- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R., 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 49-79.
- Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Shortt, C. & Salminen, S., 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal*, 9(1), 43-52.
- O'Sullivan, L., Murphy, B., McLoughlin, P., Duggan, P., Lawlor, P.G., Hughes, H. & Gardiner, G.E. ,2010. Prebiotics from marine macroalgae for human and animal health applications. *Marine drugs*, 8(7), 2038-2064.
- Ötleş ve Pire., 1999. Pektinin çeşitli gıda sistemlerindeki fonksiyonel özellikleri, *Gıda Bilim ve Teknolojisi*,4(2), 57-62.

- Özden, A., 2005. Gastrointestinal Sistem ve Probiyotik-Prebiyotik-Sinbiyotik. *Güncel Gastroenteroloji*. 9(3): 124-133.
- Özyurt, V. H., & Ötleş, S., 2014. Prebiyotikler: metabolizma için önemli bir gıda bileşeni. *Akademik Gıda*, 12(1), 115-123.
- Padera RF., 2006. Infection in ventricular assist device: the role of biofilm. *Cardiovasc Pathol* 15: 264– 270.
- Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissue. *Ann Rev Microbiol* 1994; 48: 585–617.
- Patterson, J. & Burkholder, K., 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Science*, 82(4), 627-631.
- Patel, A.K, Ahire, J.J., Pawar, S.P., Chaudhari, B.L., Chincholkar, S.B., 2009. Comparative accounts of probiotic characteristics of *Bacillus* spp. Isolated from food wastes. *Food Resources International*, 42:505-510.
- Payot, T., Chemaly, Z., & Fick, M. (1999). Lactic acid production by *Bacillus coagulans* kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(3-4), 191-199.
- Peker, H. (2012). Keçiyoynuzu gamı kullanılarak az yağlı yoğurt ve zeytin yaprağı ekstraktı kullanılarak fonksiyonel meyveli yoğurt üretimlerinin araştırılması (Master's thesis, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Pereira, I. A. D., McCartney, L.A. and Gibson, R.G., 2003. An in vitro study of the probiotic potential of a bile- salt-hydrolyzing lactobacillus strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. *American Society for Microbiology*. 69 (8): 4743-4752.
- Pereira, P.H.F., Oliveira, T.I.S., Rosa, M.F., Cavalcante, F.L., Moates, G.K., Wellner, N., Waldron, K.W. Azeredo, H.M.C. 2016. Pectin extraction from pomegranate peels with citric acid. *International Journal of Biological Macromolecules* 88: 373-379.

- Permpoonpattana, P., Hong, H.A., Khaneja, R., Cutting, S.M., 2012. Evaluation of *Bacillus subtilis* strains as probiotics and their potential as a food ingredient. *Beneficial Microbes*, 3(2):127-135.
- Perussello, C.A., Zhang, Z., Marzocchella, A., Tiwari, B.K., 2017. Valorization of apple pomace by extraction of valuable compounds. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5):776-796.
- Phillips, G.O. ve Williams, P.A., 2000. *Handbook of Hydrocolloids*. CRC Press, ISBN-978 1 84569 414 2, Boca Raton, Florida.
- Pompei, A., Cordisco, L., Amaretti, A., Zanoni, S., Matteuzzi, D., Rossi, M., 2007. Folate production by bifidobacteria as a potential probiotic property. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 179-185.
- Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD., 2004. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 12 : 185-190.
- Ramon-Blanco, C., Sanz-Gomez, J.J., Lopez-Diaz, T.M., Otero, A. and Garcia-Lopez, M.L., 1999. Numbers and Species of *Bacillus* during the Manufacture and Ripening of Castellano Cheese. *Milchwissenschaft-Milk Science International*, 54: 385-388.
- Rammani, P., Chitarrari, R., Tuohy, K., Grant, J., Hotchkiss, S., Philp, K., Campbell, R., Gill, C. & Rowland, I., 2012. In vitro fermentation and prebiotic potential of novel low molecular weight polysaccharides derived from agar and algininate seaweeds. *Anaerobe*, 18(1), 1-6.
- Rayman Ergün, A., Baysal, T., Çağlar, D., Tüfenk, H., & Batmaz, B., 2020. Investigating the thermal resistance of *B. coagulans* in the thyme oleoresin added tomato soup. *Pamukkale University Journal of Engineering Sciences*, 1000(1000), 0-0.
- Rehm, B. H., 2009. Algininate-based blends and nano/microbeads. *Alginates: Biology and Applications*. Springer Science & Business Media, pp. 175-211, New York.

- Roberfroid, M.B., 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional foods?. *The American journal of Clinical Nutrition*, 71(6): 1682-1687.
- Ronimus, R.S., Parker, L.E., Turner, N., Poudel, S., Ruckert, A. and Morgan, H.W., 2003. A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1-2); 45-61.
- Rottava, I., Batesini, G., Silva, M. F., Lerin, L., de Oliveira, D., Padilha, F. F. & Treichel, H. (2009). Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp. *Carbohydrate Polymers*, 77(1), 65-71.
- Rueckert, A., Ronimus, R.S. and Morgan, H.W., 2005. Rapid differentiation and enumeration of the total, viable vegetative cell and spore content of thermophilic bacilli in milk powders with reference to *Anoxybacillus flavithermus*. *Journal of applied microbiology*, 99(5); 1246-1255.
- Salminen, S., Gibson, G.R., McCartney, A.L. and Isolauri, E. 2004. Influence of mode of delivery on gut microbiota composition in seven year old children. *Gut* (53), 1388-1389.
- Sanders, M.E., Gibson, G.R., Gill, H.S. & Guarner, F., 2007. Probiotics: their potential to impact human health. *Council for Agricultural Science and Technology*(36), 1-20.
- Sanders, M.E., Morelli, L., Tompkins, T.A., 2003. Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus* and *Brevibacillus*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2:101-110.
- Sağdıç O., Küçüköner, E., Özçelik, S., 2004. Probiyotik ve prebiyotiklerin fonksiyonel özellikleri. *Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 35, 221--228.
- Schachtsiek, M., Hammes, W.P. & Hertel, C., 2004. Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001T surface protein CPF mediating coaggregation with and aggregation among pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*(70), 7078-7085.
- Schiffirin, E. J., Thomas, D. R., Kumar, V. B., Brown, C., Hager, C., Van't Hof, M.A., Morley, J.E. & Guigoz, Y., 2007. Systemic inflammatory markers in

- older persons: the effect of oral nutritional supplementation with prebiotics. *The Journal of Nutrition, Health and Aging*, 11(6), 475-479.
- Schroter K, Flaschel E, Pühler A, Becker A., (2001). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* secretes the endoglucanases ENGXCA and ENGXCB: Construction of an endoglucanase-deficient mutant for industrial xanthan production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55: 727-733.
- Shang, Q., Jiang, H., Cai, C., Hao, J., Li, G., Yu, G., 2018. Gut microbiota fermentation of marine polysaccharides and its effects on intestinal ecology: An overview. *Carbohydrate Polymers*, 179, 173-185.
- Silva, M.F., Fornari, R.C.G., Mazutti, M.A., Oliveira, D., Padilha, F.F., Cichoski, A.J., et al,(2009). "Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source." *Journal of Food Engineering*, 90,119–123.
- Soccol, C. R., Sauza Vandenberghe, L.P., Spier, M. R., Pedroni Medeiros A.B., Yamaguishi, C.T., Padney, A., Thomaz-Soccol, V., Lindner, J.D.D., 2010. The Potential of Probiotics: A Review. *Food Technology and Biotechnology*, 48(4): 413-34.
- Socha, P., Stolarczyk, M. & Socha, J., 2002. Wpływ probiotyków i prebiotyków na gospodarkę lipidową. *Pediatrica Współczesna Gastroenterologia, Hepatologia i Żywnienie Dziecka*, 4, 85-88.
- Somerton, B., Lindsay, D., Palmer, J., Brooks, J., and Flint, S., 2015. Changes in sodium, calcium, and magnesium ion concentrations that inhibit *Geobacillus* biofilms have no effect on *Anoxybacillus flavithermus* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(15); 5115-5122.
- Soukoulis C., Yonekura L., Gan H.H., Behboudi-Jobbehdar S., Parmenter C. and I. Fisk. 2014. Probiotic edible films as a new strategy for developing functional bakery products: The case of pan bread. *Food Hydrocoll.* 39: 231-242.
- Suzuki, T. and Yamasato, K. 1994. Phylogeny of Spore-Forming Lactic Acid

- Bacteria Based on 16S rRNA Gene Sequences. *FEMS Microbiol. Lett.*, 115: 13-18.
- Şentürk, U., Özdamar, A., 2011. Modelling the interaction between water waves and the oscillating water column wave energy device. *Mathematical and Computational Applications*, 16(3):630-640.
- TEMEL, A., & ERAÇ, B. (2018). Bakteriyel biyofilmler: saptama yöntemleri ve antibiyotik direncindeki rolü. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 48(1), 1-13.
- Thakur, B.R., Singh, R.K. ve Handa, A.K., 1997. Chemistry and uses of pectin-a review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37(1), 47-73.
- Tompkins, T.A., Xu, X., Ahmarani, J., 2010. A comprehensive review of post-market clinical studies performed in adults with an Asian probiotic formulation. *Beneficial Microbes*, 1:93-106.
- Tripathi, M.K., Giri, S.K., 2014. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9: 225-241.
- Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E. and Salminen, S., 2001. Quality Assurance Criteria for Probiotic Bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(suppl): 393-398.
- Turhan, E. U., Erginkaya, Z., Uney, M. H., & Ozer, E. A. (2017). Inactivation effect of probiotic biofilms on growth of *Listeria monocytogenes*. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 23(4).
- Turnbaugh, P.J., Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Knight, R., Gordon, J.I., 2009. The effect of diet on the human gut microbiome: A metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science Translational Medicine*, 1(6): 6-14.
- Ünal, D., Tayfur, M. 2017. Biyofilm. *Güncel Gastroenteroloji*, 21(2): 108-114.
- Van den Abbeele, P., Venema, K., Van de Wiele, T., Verstraete, W. & Possemiers, S. ,2013. Different Human Gut Models Reveal the Distinct Fermentation Patterns of Arabinoxylan versus Inulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(41), 9819-9827.

- Vaughan EE., Mollet B., M de Vos, W., 1999. Functionality of probiotics and intestinal lactobacilli: light in the intestinal tract tunnel. *Current Opinion Biotechnol.*, 10, 505--510.
- Vergin, F., 1954. Antibiotics and probiotics. *Hippokrates*, 25(4), 116-119.
- Vulevic, J., Drakoularakou, A., Yaqoob, P., Tzortzis, G. & Gibson, G.R., 2008. Modulation of the fecal microflora profile and immune function by a novel trans-galactooligosaccharide mixture (B-GOS) in healthy elderly volunteers. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(5), 1438-1446.
- Vuong C, Otto M., 2002. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microb Infect*; 4: 481–489.
- Vural, T. ve Çelen, E. (2005). Gastrointestinal Sistemle Dost Mikroorganizmalar ve Probiyotikler. *Güncel Gastroenteroloji*. 9(3): 115-123.
- Watnick P, Kolter R., 2000. Biofilm city of microbes. Minireview. *J Bacteriol* ; 182: 2675-2679.
- William, G.T., M. Lesley, M. William and K. Paul., 2001. *Plant Molecular Biology*. 47: 9-27.
- Wilson, K.H. and Perini, F., 1988. Role of Competition for Nutrients in Suppression of *Clostridium difficile* by the Colonic Microflora. *Infection & Immunity*, 56: 2610-2614.
- Wüstenberg, T., 2014. General overview of food hydrocolloids. In: *Cellulose and Cellulose Derivatives in the Food Industry: Fundamentals and Applications*, Ed.: Wüstenberg, T., Wiley-VCH Verlag GmbH Co. KGaA, pp: 1-68.
- Xie, J., Rijun Z., Changjiang S., Yaoqi G., 2009. Isolation and characterization of bacteriocin produced by an isolated *Bacillus subtilis* LEB112 that exhibits antimicrobial activity against domestic animal pathogens. *African Journal of Biotechnology*, 8(20):5611-5619.
- Yahfoufi, N., Mallet, J.F., Graham, E., Matar, C. 2018. Role of probiotics and prebiotics in immunomodulation. *Current Opinion in Food Science*, 20: 82-91.

- Yanes, M., Duran,L. ve Costell, E., 2002a. Effect of hydrocolloid type and concentration on flow behaviour and sensory properties of milk beverages model systems, *Food Hydrocolloid*, 16, 605-611.
- Yanes, M., Duran,L. ve Costell, E., 2002b. Rheological and optical properties of commercial chocolate milk bevearges, *Journal of Food Engineering*, 51, 229-234.
- Yapo, B.M., 2011. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins-A new hypothetical model.*Carbohydrate Polymers*,86(2): 373-385.
- Yeo, S.K., Liong, M.T., 2010.Effect of prebiotics on via-bility and growth characteristics of probiotics in soymilk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*,90(2), 267-275.
- Yıldırım, A.E.,Altun, R.(2014). Obezite ve Mikrobiyota. *Güncel Gastroenteroloji*,18(1),106-111.
- Yılmaz, M., 2004. Prebiyotik ve Probiyotikler. *Güncel Pediatri*. 2: 142-145.
- Yoon, H., Lee, K., Kim, H.Y., Kim, H.K., Shin, D., Hong, B. and Cho, H., 2002. Gene Cloning and Biochemical Analysis of Thermostable Chitosanase (TCH-2) from *Bacillus coagulans* CK108. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66(5): 986-995.
- Yoo, S.D ve Harcum, S.W., 1999. Xanthan gum production from waste sugar beet pulp. *Bioresource Technology*, 70: 105-109.
- Zhang, Z., Wei, Q., Nie, M., Jiang, N., Liu, C., Liu, C. Li, D., Xu, L.,2018. Microstructure and bioaccessibility of different carotenoid species as affected by hot air drying: Study on carrot, sweet potato, yellow bell pepper and broccoli. *LWT-Food Science and Technology*,96: 357-363.

ÖZGEÇMİŞ

25/07/1987 'de Adana'da doğdu. İlk, orta, lise ve üniversite öğrenimini Adana'da tamamladı. 2005 yılında başladığı Çukurova Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Öğretmenliği Bölümü'nden 2009 yılında mezun oldu.2018 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Halen Manas Ortaokulunda Fen Bilimleri Öğretmeni olarak görev yapmaktadır.

