



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**ANNE SÜTÜNDEN İZOLE EDİLEN *LACTOBACILLUS* CİNSİ
BAKTERİLERİN BAZI STARTER VE PROBİYOTİK
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Hasan ÖZER**

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Meltem AŞAN ÖZÜSAĞLAM**

AKSARAY, 2015



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**ANNE SÜTÜNDEN İZOLE EDİLEN *LACTOBACILLUS* CİNSİ
BAKTERİLERİN BAZI STARTER VE PROBİYOTİK
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Hasan ÖZER**

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Meltem AŞAN ÖZÜSAĞLAM**

AKSARAY, 2015

AKSARAY ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY BELGESİ

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 142330306 numaralı Tezli Yüksek Lisans öğrencisi, "Hasan ÖZER", ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "ANNE SÜTÜNDEN İZOLE EDİLEN *LACTOBACILLUS* CİNSİ BAKTERİLERİN BAZI STARTER VE PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı tezini, aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Meltem AŞAN ÖZÜSAĞLAM
Aksaray Üniversitesi

Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Murat KAYA
Aksaray Üniversitesi

Jüri Üyeleri : Doç. Dr. İlkan Ali OLGUNOĞLU
Adıyaman Üniversitesi

Teslim Tarihi : 12 Mayıs 2015
Savunma Tarihi : 21 Mayıs 2015

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ve bu eserleri her kullanışımında alıntı yaparak yararlandığımı belirtir; bunu şerefimle doğrularım.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Hasan ÖZER

ÖNSÖZ

Süt içerdiği besin maddeleri nedeniyle insan için değerli bir besin olduğu kadar mikroorganizmalar için de uygun bir üreme ortamıdır. Probiyotik Laktik Asit Bakterileri (LAB)'nin, gıda ve sağlık alanındaki önemi, bu bakterilerin süt ve süt ürünlerinde, doğal koşullarda yaygın olarak bulunması, antimikrobiyal özellik göstermeleri, bakteriyosin üretme potansiyellerinin yüksek olması, çeşitli organik asitler ve ekzopolisakkarit üretmeleri gibi sebepler göz önüne alınarak bu çalışmada anne sütlerinden elde edilmiş olan *Lactobacillus* cinsi izolatların, bazı starter ve probiyotik özellikleri belirlenmiştir. Elde edilen veriler, sağlık ve gıda sanayinde bu konuda yapılacak araştırmalara alt yapı sağlayacaktır.

Bu çalışma, ASÜ BAP 2013/72 numaralı projeyle Aksaray Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında büyük desteğini gördüğüm, bilgi ve önerileri ile bana yol gösteren, yardım ve desteğini her zaman hissettiğim çok kıymetli Danışman Hocam Yrd. Doç. Dr. Meltem AŞAN ÖZÜSAĞLAM'a en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Her türlü desteklerinden dolayı Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi (ASÜBTAM)'ne ve izolatların tanımlanmasında yardım ve desteklerinden dolayı Tansu TANIR'a (BIOMERIEUX) teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında büyük fedakarlıklar göstererek yardım ve desteklerini esirgemeyen çok sevgili arkadaşlarım Ayşe GÜNYAKTI ve Ayşe YAVUZ'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın yapılmasını ASÜ BAP 2013/72 numaralı projeyle destekleyen Aksaray Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemi sağlayan anneme ve 1994'te Hakk'ın rahmetine kavuşan babama; hiçbir zaman maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen abime ve yengeme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ.....	i
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1. Anne Sütünün Bazı Kimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikleri.....	3
2.2. Probiyotik Mikroorganizmalar.....	5
2.3. Laktik Asit Bakterileri	9
2.4. Starter Kültürler	13
3. MALZEME VE YÖNTEM	15
3.1. İzolatların API 50 CHL Sistemiyle Tanımlanması	15
3.2. İzolatların Bazı Starter Özelliklerinin Belirlenmesi	16
3.2.1. Farklı Sıcaklıklarda Gelişme Testi	16
3.2.2. Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Gelişme Testi	16
3.2.3. İzolatların Asit Üretme Yetenekleri.....	17
3.2.4. Ekzopolisakkarit (EPS) Üretiminin Belirlenmesi.....	17
3.2.5. İzolatların Nisin Dirençliliği.....	17
3.3. İzolatların Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi	18
3.3.1. İzolatların Düşük pH'ya Toleransının Belirlenmesi.....	18
3.3.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi	18
3.3.3. Elde Edilen İzolatların Patojen Mikroorganizmalara Antimikrobiyal Etkisi	19
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	21
4.1. İzolatların API 50 CHL Sistemiyle Tanımlanması	21
4.2. İzolatların Bazı Starter Özelliklerinin Belirlenmesi	23
4.2.1. Farklı Sıcaklıklarda Gelişme Testi	23
4.2.2. Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Gelişme Testi	24
4.2.3. İzolatların Asit Üretme Yetenekleri.....	25
4.2.4. Ekzopolisakkarit (EPS) Üretiminin Belirlenmesi.....	26
4.2.5. İzolatların Nisin Dirençliliği.....	28
4.3. İzolatların Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi	35
4.3.1. İzolatların Düşük pH'ya Toleransının Belirlenmesi.....	35
4.3.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi	36
4.3.3. Elde Edilen İzolatların Patojen Mikroorganizmalara Antimikrobiyal Etkisi	41
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	49
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ.....	66

ÖZET

ANNE SÜTÜNDEN İZOLE EDİLEN *LACTOBACILLUS* CİNSİ BAKTERİLERİN BAZI STARTER VE PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada anne sütünden izole edilmiş *Lactobacillus* cinsi bakterilerin bazı probiyotik ve starter özellikleri araştırılmıştır. Anne sütünden izole edilen suşlardan basil morfolojisine sahip izolatlar API 50 CHL kiti ile tanımlanmış ve yüksek tanımlama oranına sahip üç suş seçilmiştir. Bu suşlardan birinin *Lactobacillus fermentum*, diğer iki suşun ise *Lactobacillus acidophilus* olduğu belirlenmiştir.

Tüm suşların 45 °C’de geliştiği, 15 °C’de ise M2-24 ve M2-43 numaralı suşların zayıf geliştiği, M2-6 numaralı suşun gelişmediği belirlenmiştir. Tüm suşlar, % 2, % 4, % 5 oranında NaCl içeren ortamlarda gelişim göstermiş, ancak M2-24 numaralı suşun % 5 NaCl içeren ortamda zayıf geliştiği gözlenmiştir. 48 saat içerisinde yapılan pH ölçümlerine göre pH’nın zamanla azaldığı ve üç suşun da asit üretme yeteneğine sahip olduğu görülmüştür. M2-6 numaralı suş 4,34 g/L ile en yüksek Ekzopolisakkarit (EPS) üretimine sahiptir. Bununla birlikte diğer iki suşun EPS üretimleri de yüksektir. M2-6 numaralı suşun tüm nisin konsantrasyonlarında nisine direnç gösterdiği belirlenmiştir. Aynı zamanda M2-43 numaralı suşun M2-24’e kıyasla nisine daha dirençli olduğu belirlenmiştir.

Tüm suşların düşük pH’da geliştikleri, ancak M2-24 suşunun zayıf geliştiği belirlenmiştir. Tüm suşların kanamycine dirençli olduğu, ancak ampicillin, erythromycin ve penicillin G türü antibiyotiklere karşı duyarlı oldukları tespit edilmiştir. İzolatların insan patojen mikroorganizmalara antimikrobiyal etkisini belirlemeye yönelik çalışmada M2-6 numaralı suş antimikrobiyal aktivite göstermezken, M2-24 ve M2-43 numaralı suşların ise test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. İzolatların balık patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisini belirlemeye yönelik çalışmada üç suşun da *A. hydrophila* ATCC 19570’e karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği, bunun yanında M2-24 numaralı suşun *L. garvieae*, *Y. ruckeri* ve *V. anguillarum* M1’e karşı, M2-43 numaralı suşun ise *V. anguillarum* M1’e karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Anne sütü, *Lactobacillus*, Starter, Probiyotik

ABSTRACT

DETERMINATION OF SOME STARTER AND PROBIOTIC PROPERTIES OF *LACTOBACILLUS* BACTERIA ISOLATED FROM HUMAN MILK

In this study, some starter and probiotic properties of *Lactobacillus* bacteria isolated from human milk were researched. The isolates which have bacillus morphology from human milk were selected. Then the isolates were identified with API 50 CHL kit and were selected three strains which had high definition rate. One was identified as *Lactobacillus fermentum* and the other two strains were identified as *Lactobacillus acidophilus*.

It was determined that, all of the strains developed in 45 °C; whereas in 15 °C, the strains of M2-24 and M2-43 developed weakly and M2-6 didn't grow at all. All of the strains developed at growth medium containing 2%, 4%, 5% NaCl, however it was observed that the M2-24 strain developed weakly in growth medium containing 5% NaCl. During the pH measurements in 48 hours, it was observed that pH reduced in time and all three strains had acid production ability. The M2-6 strain had the highest rate of exopolysaccharide (EPS) producing with 4.34 g/L. At the same time other two strains had a high EPS production rate, too. It was determined that the M2-6 strain showed resistance against all tested nisin concentrations. At the same time, M2-43 strain showed more resistance against nisin than M2-24 strain.

It was determined that all of the strains grew in low pH, but M2-24 strain grew weakly. All of the strains were resistant against kanamycin, on the other hand were sensitive to ampicillin, erythromycin and penicillin G antibiotics. In the determination of antimicrobial activity against the human pathogen microorganisms, M2-6 strain showed no antimicrobial activity. It was observed that the strains of M2-24 and M2-43 showed antimicrobial activity against the test microorganisms. In the determination of antimicrobial activity on fish pathogen microorganisms, it was observed that all three strains showed antimicrobial activity on *A. hydrophila* ATCC 19570, besides, M2-24 strain showed antimicrobial activity against *L. garvieae*, *Y. ruckeri* and *V. anguillarum* M1 and M2-43 strain showed antimicrobial activity against *V. anguillarum* M1.

Key Words: Human milk, *Lactobacillus*, Starter, Probiotic

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 4.1: M2-6 numaralı suşun 48 saatlik inkübasyondan sonraki API 50 strip’indeki görünümü	22
Şekil 4.2: M2-24 numaralı suşun 48 saatlik inkübasyondan sonraki API 50 strip’indeki görünümü	22
Şekil 4.3: M2-43 numaralı suşun 48 saatlik inkübasyondan sonraki API 50 strip’indeki görünümü	22
Şekil 4.4: İzolatların EPS üretim miktarları	28
Şekil 4.5: M2-6 numaralı suşun 50, 100, 150, 200, 250, 300 µg/mL konsantrasyonlardaki nisine dirençliliği	32
Şekil 4.6: M2-6 numaralı suşun 300, 350, 400, 450, 500 µg/mL konsantrasyonlardaki nisine dirençliliği	32
Şekil 4.7: M2-24 numaralı suşun 50, 100, 150, 200, 250, 300 µg/mL konsantrasyonlardaki nisine dirençliliği	33
Şekil 4.8: M2-24 numaralı suşun 300, 350, 400, 450, 500 µg/mL konsantrasyonlardaki nisine dirençliliği	33
Şekil 4.9: M2-43 numaralı suşun 50, 100, 150, 200, 250, 300 µg/mL konsantrasyonlardaki nisine dirençliliği	34
Şekil 4.10: M2-43 numaralı suşun 300, 350, 400, 450, 500 µg/mL konsantrasyonlardaki nisine dirençliliği	34
Şekil 4.11: M2-6 numaralı suşun ampicilline karşı antibiyotik duyarlılık testi	37
Şekil 4.12: M2-6 numaralı suşun gentamicine karşı antibiyotik duyarlılık testi	37
Şekil 4.13: M2-6 numaralı suşun erythromycine karşı antibiyotik duyarlılık testi ...	38
Şekil 4.14: M2-6 numaralı suşun kanamycine karşı antibiyotik duyarlılık testi	38
Şekil 4.15: M2-6 numaralı suşun penicillin G’ye karşı antibiyotik duyarlılık testi .	38
Şekil 4.16: M2-24 numaralı suşun ampicilline karşı antibiyotik duyarlılık testi	38
Şekil 4.17: M2-24 numaralı suşun gentamicine karşı antibiyotik duyarlılık testi	39
Şekil 4.18: M2-24 numaralı suşun erythromycine karşı antibiyotik duyarlılık testi	39
Şekil 4.19: M2-24 numaralı suşun kanamycine karşı antibiyotik duyarlılık testi	39
Şekil 4.20: M2-24 numaralı suşun penicillin G’ye karşı antibiyotik duyarlılık testi	39
Şekil 4.21: M2-43 numaralı suşun ampicilline karşı antibiyotik duyarlılık testi	40
Şekil 4.22: M2-43 numaralı suşun gentamicine karşı antibiyotik duyarlılık testi	40
Şekil 4.23: M2-43 numaralı suşun erythromycine karşı antibiyotik duyarlılık testi	40
Şekil 4.24: M2-43 numaralı suşun kanamycine karşı antibiyotik duyarlılık testi	40
Şekil 4.25: M2-43 numaralı suşun penicillin G’ye karşı antibiyotik duyarlılık testi	41
Şekil 4.26: M2-24 numaralı suşun <i>S. aureus</i> ATCC 29212 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi	46
Şekil 4.27: M2-43 numaralı suşun <i>S. aureus</i> ATCC 29212 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi	46
Şekil 4.28: M2-24 numaralı suşun <i>S. enteridis</i> RSKK 171 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi	46
Şekil 4.29: M2-43 numaralı suşun <i>S. enteridis</i> RSKK 171 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi	46

Şekil 4.30: M2-24 numaralı suşun <i>E. coli</i> O157:H741 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi	46
Şekil 4.31: M2-43 numaralı suşun <i>E. coli</i> O157:H741 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi	46
Şekil 4.32: M2-24 numaralı suşun <i>E. coli</i> ATCC 35218 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi	47
Şekil 4.33: M2-43 numaralı suşun <i>E. coli</i> ATCC 35218 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi	47
Şekil 4.34: M2-24 numaralı suşun <i>S. enteridis</i> ATCC 13076 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi	47
Şekil 4.35: M2-43 numaralı suşun <i>S. enteridis</i> ATCC 13076 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi	47
Şekil 4.36: M2-24 numaralı suşun <i>S. sonnei</i> Mu:57 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi	47
Şekil 4.37: M2-43 numaralı suşun <i>S. sonnei</i> Mu:57 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi	47
Şekil 4.38: M2-24 numaralı suşun <i>A. hydrophila</i> üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi	48
Şekil 4.39: M2-43 numaralı suşun <i>A. hydrophila</i> üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1: Sağlıklı annelerin sütünden izole edilmiş bakteri türleri	5
Çizelge 2.2: Probiyotik ürünlerde kullanılan mikroorganizmalar	9
Çizelge 4.1: M2-6, M2-24, M2-43 numaralı suşların API 50 CHL sistemi ile identifikasyonu	21
Çizelge 4.2: İzolatların farklı sıcaklıklarda gelişme testi	23
Çizelge 4.3: İzolatların farklı farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme testi	24
Çizelge 4.4: İzolatların asit üretme yetenekleri	26
Çizelge 4.5: İzolatların EPS üretim miktarları	26
Çizelge 4.6: İzolatların nisine karşı gösterdikleri duyarlılık ve dirençlilikleri	30
Çizelge 4.7: İzolatların pH=3,9'da gelişimleri	35
Çizelge 4.8: İzolatların antibiyotik duyarlılık testi zon çapları	36
Çizelge 4.9: İzolatların insan patojen mikroorganizmalara antimikrobiyal etkisi	43
Çizelge 4.10: İzolatların balık patojen mikroorganizmalara antimikrobiyal etkisi ..	44

SİMGELER DİZİNİ

cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
L	Litre
°C	Santigrat Derece
μ	Mikron
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre

KISALTMALAR DİZİNİ

EPS	Ekzopolisakkarit
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GRAS	Generally Recognised as Safe/ Genelde Güvenilir olarak Bilinen
LAB	Laktik asit bakterileri
LABIP	Laktik Asit Bakteri Endüstriyel Platformu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Anne sütü tüm bebekler, prematüreler ve hasta yeni doğanlar için son derece ideal bir besindir. Yeni doğanların savunma sisteminde önemli bir yer tutar. Anne sütü içerdiği bileşenler açısından, bebeğin yaşına ve fizyolojik özelliklerine göre değişen en uygun besindir. Anne sütündeki kalsiyumun emilimi daha kolaydır ve demir oranı daha yüksektir. İçerisinde enfeksiyonlara karşı vücut direncini artıran immunoglobülinler vardır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar probiyotiklerin bağırsıklık sistemini güçlendirerek mide-bağırsak hastalıklarına karşı konakçıyı koruduğunu ortaya koymuştur (Musumeci vd., 2006; Fukushima vd., 1998).

Probiyotikler, bağırsak sisteminin mikrobiyal florasını değiştirerek insan sağlığı üstünde olumlu etkiler gösteren mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (Anonim, 2005).

Probiyotiklerin çoğu “laktik asit bakterileri” (LAB) olarak tanımlanmış, insan mide-bağırsak mikroflorasının önemli bir parçası olan, zararlı özellik taşımayan geniş bir bakteri grubudur (Gionchetti vd., 2000).

Günümüzde probiyotik içeren birçok süt ürününün endüstriyel üretimi gerçekleştirilmektedir. İnsan ve hayvanların bağırsak sisteminden izole edilen *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* ve *Bifidobacterium* türleri, bu amaçla en yaygın kullanım alanı bulan bakterilerdir. Bu bakteriler ile hazırlanan probiyotik preparatlarının endüstriyel gıda üretim süreçlerinde kullanımı, tüketici talepleri doğrultusunda, giderek yaygınlık kazanmaktadır. Zira dünya nüfusunun artmasıyla birlikte, artan hazır gıda tüketiminde, mikrobiyal kontaminasyonlar temel sorunu teşkil etmektedir (Dunne, 2001).

1919 yılında Orla-Jensen’in yapmış olduğu çalışmada LAB; Gram pozitif, katalaz negatif, hareketsiz, sporsuz, çubuk veya kok şeklinde, karbonhidratları ve yüksek alkollerle fermente ederek laktik asit oluşturan, naturel bir grup olarak tanımlanmıştır. LAB’nin veya laktiklerin ortak özelliği, laktozdan laktik asit fermentasyonu sonucu laktik asit oluşturmalarıdır. Laktik fermentasyonla, besinlerde hem tat, koku gibi özelliklerin oluşumu hem de fermentasyon sağlanmaktadır (Salminen ve Wright, 1993; Tekinşen ve Atasever, 1994).

Fermentasyonda rol oynayan mikroorganizmaların doğal olarak hammadde de yeterli düzeyde bulunduğu gıdalarda fermentasyon, starter kültür ilave edilmeden doğal fermentasyonla gerçekleştirilebilmesine karşın, starter kültür kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyonlar, standart ve daha yüksek kalitede ürünlerin üretilmesine olanak sağlamaktadır (Holzapfel, 1997).

Bu çalışma kapsamında;

1. Anne sütünden izole edilmiş *Lactobacillus* cinsi bakterilerin gıda sanayinde kullanım potansiyellerini belirlemek amacıyla bazı starter özellikleri belirlenmiştir. Bu kapsamda; izolatların asit üretme yetenekleri belirlenmiştir.
2. Ayrıca peynirde koruyucu olarak kullanılan nisin starter bakteriler üzerinde de antimikrobiyal etki gösterebildiğinden starter kültürlerin seçiminde bakterilerin nisin dirençlilikleri belirlenmiştir.
3. İzolatların ekzopolisakkarit üretimleri peynirde kıvamı oluşturmada ve probiyotik açıdan önemi nedeni ile araştırılmıştır.
4. Çalışmada izolatların, starter ve probiyotik bakteri kültürlerinin gelişimini olumsuz etkilediği düşünülen ve klinikte kullanımı yaygın olan antibiyotiklere karşı dirençleri belirlenmiştir.
5. Probiyotik olarak kullanımı araştırılan LAB'nin insanlarda ve balıklarda hastalık yapan bazı patojen mikroorganizmalar üzerinde inhibisyon özellikleri araştırılmıştır.
6. Suşların aynı zamanda probiyotik açıdan önemli kriterlerden olan farklı sıcaklık ve düşük pH koşullarına toleransı da tespit edilmiştir.
7. Peynir gibi tuzlu gıdaların fermentasyonunda starter kültür olarak kullanım potansiyeli açısından, izolatların farklı tuz konsantrasyonlarında gelişimi incelenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Anne Sütünün Bazı Kimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikleri

Bebeğe anne sütü vasıtasıyla aktarılan temel besin maddeleri dışında birçok işlevsel bileşen vardır. Anne sütünün, bebeğin fiziksel gelişiminin yanında zihinsel gelişim ve bağışıklık sisteminin gelişimi açısından da büyük önemi vardır. Anne sütüyle ilgili yapılan çoğu çalışma anne sütünün organik yapısı üzerine gerçekleşmiştir. Anne sütünü oluşturan temel maddeler proteinler, laktoz ve trigliseritlerdir. Bu maddeler diğer canlılarla benzer olmakla birlikte oran olarak diğer canlılardan oldukça farklıdır. Anne sütünü diğer memelilerin sütünden farklılaştıran en temel özellik içerisindeki aktif bileşenlerin fazla olmasıdır. Bu bileşenlerin en önemlilerinden biri immunoglobulinlerdir (Alpkent ve Kubat, 2002).

Anne sütünün sitokinler, bağışıklık hücreleri, poliaminler ve oligosakkaritler gibi pek çok biyoaktif moleküller bakımından zengin olduğu iyi bilinmekteyken; yenidoğanların bağırsaklarında kolonize olarak, bağırsak fonksiyonlarını düzenleyen kommensal ve probiyotik bakterilerin kaynağı olduğu ancak son zamanlarda kabul edilmiştir (Fernandez vd., 2013).

Yeni doğanların immün sistemini oluşturan maddeler yetişkin bir insanın yüzde bir ila ikisi kadardır (Hanson ve Korotheva, 2002). Bu nedenle anne sütü, bebeğin immün sisteminin hızlı bir şekilde gelişmesi için en önemli kaynaktır.

Süt, anneden çocuğa birçok temel maddenin taşınması için önemli bir araçtır. Anne sütü çocuğun büyümesi ve gelişmesi için gerekli besinleri içermekle birlikte aynı zamanda mikrobiyolojik korumayı, bağışıklık sisteminin olgunlaşmasını ve düzenlenmesini ayrıca sindirim sisteminin doğum sonrası olgunlaşmasını sağlar (Weaver, 2003).

Bağırsak sisteminde bulunan faydalı mikroorganizmaların gıdaların sindirimine yardımcı olmak, canlıyı patojen mikroorganizmalardan korumak ve canlının savunma mekanizmasını desteklemek gibi işlevleri vardır. Doğumdan hemen sonra ortamdan, anneden ve anne sütünden kazanılan doğal floradaki ana grubu LAB oluşturmaktadır (Karahan ve Çakmakçı, 1996).

Yapılan araştırmalar sonucu patojen olmayan mikroorganizmaların, bünyede immunoglobulin seviyesini arttırdığı, böylece vücut savunma mekanizmasının da daha hızlı geliştiği gösterilmiştir. Bu etkiyi gösteren mikroorganizmaların en önemlileri laktik asit bakterileridir (Claridge, 2006).

Anne sütü üzerine yapılan mikrobiyolojik çalışmaların çoğu, anne sütü içeriğinde bulunan ve anne s t yle birlikte bebeğe geçebilmesi söz konusu olan patojen mikroorganizmalar üzerine gerçekleştirilmiştir. Son yıllarda yapılan mikrobiyolojik çalışmalar anne sütünün patojen mikroorganizmalardan çok daha fazla LAB içerdiğini göstermiştir (Martin vd., 2004).

Anne sütünde bulunan bakterilerden, en sık rastlanılanları *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* ve *Lactobacillus* türleridir (Heikkil  ve Saris, 2003; Martin vd., 2003).

Günümüze kadar anne sütünden izole edilen *Lactobacillus* türleri *L. gasseri*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum* ve *L. salivarius*'tur. (Heikkil  ve Saris, 2003; Martin vd., 2003). Potansiyel probiyotik olarak kabul edilen bu türlere ilgi her geçen g n artmaktadır.

 izelge 2.1'de sağlıklı anne s tlerinden izole edilmiş bakteri t rleri yer almaktadır.

Çizelge 2.1: Sağlıklı annelerin sütünden izole edilmiş bakteri türleri (Martin vd., 2003; Martin vd., 2005; Martin vd., 2006).

Bakteri Grubu	Ana Türler
<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>S. epidermidis</i>
	<i>S. hominis</i>
	<i>S. capitis</i>
	<i>S. aureus</i>
<i>Streptococcus spp.</i>	<i>S. salivarius</i>
	<i>S. mitis</i>
	<i>S. parasanguis</i>
	<i>S. peores</i>
<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>L. gasseri</i>
	<i>L. rhamnosus</i>
	<i>L. acidophilus</i>
	<i>L. plantarum</i>
	<i>L. fermentum</i>
	<i>L. salivarius</i>
<i>Enterococcus spp.</i>	<i>L. reuteri</i>
	<i>E. faecium</i>
	<i>E. faecalis</i>

2.2. Probiyotik Mikroorganizmalar

Probiyotik kelimesi Yunanca pros ve bios kelimelerinden türetilmiştir. Yaşam için anlamına gelmektedir ki yaşama karşı anlamına gelen ‘antibiyotik’ kelimesinin karşıtıdır. Probiyotik tarihi fermente gıda tüketimiyle iyi bilinen Yunan ve Romalılar ile başlamıştır (Gismondo vd., 1999; Guarner vd., 2005).

İlk kez 1908 yılında Nobel Ödüllü Rus Araştırmacı Ellie Metchnikoff probiyotiklerin insan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerinden bahsetmiştir. Metchnikoff Bulgarların

uzun ve sağlıklı yaşamlarının, çubuk şeklinde bakteriler (*Lactobacillus spp.*) içeren fermente süt ürünleri tüketimlerine bağlı olduğu varsayımında bulunmuştur. Uzun yaşamın nedenini ise bu bakterilerin bağırsak mikroflorasını olumlu yönde etkilemesine ve mikrobiyal toksik aktiviteyi azaltmalarına bağlamıştır (Gismondo vd., 1999; akır, 2003; Chuayana vd., 2003).

Sindirim sisteminde bulunan yararlı mikroorganizmalar, besin maddelerinin sindirilmesine yardımcı olurken, açığa çıkardıkları bazı maddeler yardımı ile organizmayı patojen mikroorganizmaların zararlı etkilerine karşı korurlar. Bu mikroorganizmalar “probiyotik mikroorganizmalar” olarak isimlendirilir. LAB’nin bazı cins ve türleri probiyotik mikroorganizmalar grubu içerisine dahildir. LAB insan sağlığı ve gelişimi için çok önemli olan süt ürünlerinin üretilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. LAB türleri çok eski zamanlardan beri çeşitli fermente gıda ürünlerinin üretiminde kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları günümüzde fermente gıda ürünlerinin elde edilmesinde starter (başlatıcı) kültür olarak çok yaygın şekilde kullanılmaktadırlar. İnsan sindirim sisteminin mikrobiyal florasının önemli bir kısmını LAB oluşturmaktadır. Laktik asit bakterileri sindirim sisteminin haricinde, vajina, deri ve sa gibi vücudun diğer bölümlerinde de bulunmaktadır. Bulundukları bölümde ürettikleri asetaldehit ve CO₂ gibi maddeler ortamın pH değerini değiştirir, eksprese ettikleri bakteriyosin benzeri maddelerle de diğer bakterilerin gelişmelerini önlemeye çalışırlar. Ayrıca LAB enfeksiyonlardan koruma, laktozu parçalama, kanserden koruma ve serum kolesterol düzeyini düşürme gibi etkilerine yönelik araştırmalar giderek artmaktadır (Tannock vd., 1999; Shinoda vd., 2001; McCartney vd., 1996; Matsumiya vd., 2002; Tannock vd., 2000; Klein vd., 1998; Kışla ve Ünlütürk, 1998; Heyman, 2002).

Probiyotiklerin bu olumlu etkileri gösterebilmeleri için konağın bağırsağında kolonize olmaları gerekmektedir. Günümüzde birçok hastalığın tedavisinde ve hastalıklardan korunmada probiyotik kullanımına eğilim artan bir oranla devam etmektedir (Wallace, 2009).

Probiyotiklerin olumlu etkileri gsterildike çocuklardaki kullanım oranları da giderek artmaktadır. Çocukların probiyotikleri kullanması ya da kullanılmasının önerildiği başlıca hastalıklar akut gastroenteritler, *Clostridium difficile* enfeksiyonu

ve antibiyotik ishali, enflamatuvar bağırsak hastalıkları, irritabl bağırsak hastalığı, kabızlık, *Helicobacter pylori* tedavisi, nekrotizan enterokolit ve kısa bağırsak sendromu gibi gastrointestinal hastalıklar, besin alerjileri, egzama, atopik dermatit, alerjik rinit ve astım gibi alerjik ve solunum yolları hastalıkları ve ürogenital hastalıklardır (Wallace, 2009; Vanderhoof ve Young, 1998; Szajewska ve Mrukowics, 2005; Vanderhoof vd., 1999; Miele vd., 2009; Bausserman ve Michail, 2005; Bekkali vd., 2007; Alfaleh, 2014; Sentengo vd., 2008; Goldman vd., 2006; Yao vd., 2010; Reid, 2002).

Probiyotiklerin kanser oluşumu riskini azalttığı birçok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur. *L. acidophilus* tüketiminin kolon kanserini önlediği tespit edilmiştir. Bu çalışmaya sağlıklı bireylerden 21 adet gönüllü katılmış ve *L. acidophilus* kültürü süt veya yoğurda katılarak deneklere verilmiştir. Araştırmacılar bir aylık uygulama periyodundan sonra feçesteki prokarsinojenleri karsinojene dönüştüren bakteriyel enzim konsantrasyonunda önemli azalmalar olduğunu bildirmişlerdir. Benzer çalışmalarda *L. acidophilus* katılmayan sütlerde ise aynı sonuç alınamamıştır (Çakır, 2003; Goldin vd., 1992; Sanders, 1999; Brady vd., 2000; Goldin ve Gorbach, 1984; Gmeiner vd., 2000).

Probiyotik bir mikroorganizmanın tanımı için zorunlu kriterler LABIP (Laktik Asit Bakteri Endüstriyel Platformu) tarafından belirlenmiştir (Guarner ve Schaafsma, 1998; Ewaschuk ve Dieleman, 2006). Buna göre probiyotik potansiyeli taşıyan mikroorganizmalar:

İnsan orjinli olmalıdır,

Patojen özellik içermemelidir,

Gastrik asit ve safra tuzuna direnç göstermelidir,

Bağırsak epitel dokularına tutunmalıdır,

Gastrointestinal sistemde kısa süreler için de olsa sürekliliğini devam ettirebilmelidir,

Antimikrobiyal bileşikler üretebilmelidir,

İmmün cevabı stimüle edebilmelidir,

Metabolik etki kabiliyeti olmalıdır (kolesterol asimilasyonu, laktaz aktivitesi, vitamin üretimi),

Teknolojik süreçlere direnç göstermelidir.

Farklı kaynaklarda ise probiyotiklerde bulunması gereken bazı özellikler aşağıdaki gibi sıralanmıştır:

Güvenilir olmalıdır. Kullanıldığı insan ve hayvanda yan etki oluşturmamalıdır.

Stabil olmalıdır. Düşük pH ve safra tuzları gibi olumsuz çevre koşullarından etkilenmeden bağırsakta metabolize olmalıdır.

Bağırsak hücrelerine tutunabilmeli ve kolonize olabilmelidir.

Karsinojenik ve patojenik bakterilere antagonistik etki yapmalıdır.

Konakçıda hastalıklara direnç gibi yararlı etkiler oluşturabilmelidir.

Antibiyotiklere dirençli olmalıdır. Antibiyotiğe bağlı ortaya çıkan hastalıklarda (diyare) bağırsak florasını düzenlemek amacı ile kullanılabileceğinden, bağırsaktaki antibiyotiklerden etkilenmemelidir.

Üretim ve depolama sırasında canlılığını ve aktivitesini koruyabilmelidir.

Probiyotikler patojenik olmamalı ve toksin üretmemelidir. Çok suşlu preparatların hazırlanmasına uygun olmalıdır.

Probiyotik üretiminde kullanılan suşlar aktarılabılır antibiyotik direnç genleri içermemelidir (Gismondo ve Drago, 1999; Yılsay ve Kurdal, 2000; Yıldırım ve Yıldırım, 2000; Saarela vd., 2000).

İnsan ve hayvan besinlerindeki probiyotik ürünlerde kullanılan mikroorganizmalar Çizelge 2.2’de belirtilmiştir.

Çizelge 2.2: Probiyotik ürünlerde kullanılan mikroorganizmalar (Yavuzdurmaz, 2007).

<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Bifidobacterium spp.</i>	Diğerleri
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>E. faecium</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. breve</i>	<i>Streptococcus salivarius subsp.</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. infantis</i>	<i>thermophilus</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>B. longum</i>	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>
<i>L. delbrueckii subsp.</i>	<i>B. lactis</i>	<i>L. lactis subsp. cremoris</i>
<i>bulgaricus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>L. crispatus</i>		<i>freudenreichii</i>
<i>L. plantarum</i>		<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. salivarius</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. johnsonii</i>		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. gallinarum</i>		
<i>L. fermentum</i>		
<i>L. helveticus</i>		

2.3. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri, Gram pozitif, katalaz negatif, fakültatif anaerobik, spor oluşturmeyen, kokobasil ya da basil şekilli, kromozomal DNA yapısındaki guanin+sitozin (G+C) oranı % 55'den az olan bakterilerdir. Laktik asiti en fazla karbohidrat fermentasyonu esnasında üretirler. Bunun yanında tür ve cins karakterlerine bağlı olarak asetik asit, karbondioksit, alkol ve bazı tat ve aroma maddelerini de üretebilirler. Bunun yanında laktik asit bakterileri gıdaların bozulmasına neden olan mikroorganizmalar ve çeşitli hastalıklara neden olan patojen mikroorganizmalar üzerinde de ürettikleri laktik asit ve bazı antimikrobiyal maddeler (bakteriyosin v.s.) nedeniyle öldürücü etkiye sahiptirler (Stiles ve Holzaphel, 1997; Turantaş, 1999).

Probiyotik olarak kullanılan en yaygın laktik asit bakterileri sınıflandırmada 6 gruba ayrılırlar (Tannock, 1997). Bunlar; *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Bifidobacterium*'dur (Tannock, 1997).

Laktobasillerin klasik sınıflandırmaları fermentatif özelliklerine göre yapılmaktadır. Bunlar;

1. Obligat homofermantatif laktobasiller: Empden-Meyerhof Parnas metabolik yolunu kullanarak heksozları sadece laktik asite fermente ederler. Örneğin; *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*.
2. Fakültatif heterofermantatif laktobasiller: Empden-Meyerhof Parnas metabolik yolunu kullanarak heksozları sadece laktik asite fermente ederken bazı türler ise glikoz sınırlamasında laktik, asetik, formik asit ve CO₂ üretmektedir. Pentozları da fosfoketolaz yolunu kullanarak laktik ve asetik asite fermente ederler. Örneğin; *L. casei*, *L. plantarum*, *L. sake*.
3. Obligat heterofermantatif laktobasiller: Heksozları laktik, asetik asit, etanol ve CO₂'e, pentozları ise laktik ve asetik asite fermente ederler. Örneğin; *L. bifermentas*, *L. brevis* ve *L. fermentum* (Kandler ve Weiss, 1986; Schleifer, 1987).

LAB, glikoz metabolizması sonucunda ürettikleri son ürüne bağlı olarak iki ana gruba ayrılırlar (Turantaş, 1999).

1. Hekzoz şekerinden fermentasyon sonucu birincil dereceden laktik asit üreten türlere homofermantatif laktik asit bakterileri denilmiştir. Homofermantatif laktik asit, homolaktik karakterleri ortamın pH'sı, besin maddeleri ve ortamın glikoz yoğunluğu gibi kültürel koşulların değişmesiyle farklılık gösterirler. Bazı homofermantatif LAB, pentozları kullanarak laktik asit ve asetik asit üretebilirler. Bu gruba dahil LAB heterofermantatif laktik asit bakterilerine oranla iki kat daha fazla enerji üretebilmektedirler (Andrighetto vd., 1998).
2. Metabolik faaliyetler sonucu hekzozlardan laktik asit, CO₂ ve etanol üreten LAB ise heterofermantatif laktik asit bakterileri olarak isimlendirilir. Heterofermantatif türler asetaldehit ve diasetil gibi tat ve aroma bileşenlerinin üretimi açısından önem taşırlar (Turantaş, 1999).

Doğada oldukça yaygın olan *Lactobacillus* cinsi LAB, hayvan ve insan bağırsaklarında, fermente süt ürünlerinde, anne sütünde, ağızda ve deride

bulunabilmektedir. Basil şeklinde olan bu bakteriler, düzgün çubuk, kokobasil veya uzun zincir oluşturan basil şeklinde bulunabilirler. Birkaç tür veya suşun dışında genellikle hareketsizdirler. Gram pozitif olan bu bakteriler, kültürlerin eskimesi ile gram negatif ve uzun zincir görünümünü de gösterebilirler. Spor oluşturmayan, ve genellikle anaerob bakterilerdir. Optimum üreme sıcaklıkları 5–55 °C arasında değişebilir. Optimum üreme pH 5,5–5,8 aralığındadır. Bu bakterilerin gelişebilmek için kompleks besin maddeleri ve vitaminlere gereksinimleri vardır . Bu türler fermente sebze, et ve süt ürünlerinin üretiminde rol oynarlar (Tannock, 1999; Turantaş, 1999; Sneath vd., 1986).

Lactobacillus cinsinin taksonomisi tam olarak belirlenmiş ve bu cins içinde 50 tür bulunmaktadır. *Lactobacillus* cinsi bakterilerin gelişebilmesi için üreme ortamında amino asit, peptit, nükleik asit türevi vitamin, tuz, yağ asidi veya yağ asidi esterleri ile fermente edebilecekleri besin maddelerinin bulunması gerekir. 10-30 µ uzunluğunda, 0,7-2 µ kalınlığında, tek tek veya zincirler halinde bulunurlar. Genç bakteriler genelde zincir oluşturmazlar (Yetişmeyen, 1995; Yeniel, 2006).

L. acidophilus, asidik ortamda gelişim gösterebilen laktik asit bakterisi anlamına gelmektedir. Çubuk şeklinde olan bu bakteri tekli, ikili ya da kısa zincir oluşturmaktadır. Mikroskopta tek ya da kısa zincirler şeklinde görülmektedir. Anaerob ya da fakültatif anaerob, hareketsiz, katalaz negatif, flagellasız ve homofermentatif bir bakteri olup % 0,3–1,9 oranında DL laktik asit üretebilmektedir. Gelişebildiği sıcaklık aralığı 35–38 °C olup optimum 37 °C'dir. Optimum pH değeri ise 5,5–6,0'dır. Gelişmesi için ortamın başlangıç pH'sının 5–7 arasında olması gerekmektedir (Kılıç, 2001; Yılmaztekin, 2001; Gürsoy ve Kayardı, 1999).

L. acidophilus'un safra tuzlarına çok dayanıklı olduğu, bu bakteriyi diğer potansiyel *Lactobacillus* türlerinin ve bifidobakterilerin takip ettiği bildirilmiştir (Vinderola ve Reinheimer, 2003).

L. acidophilus gibi probiyotik türler 70 yıldan daha uzun bir süredir güvenli bir şekilde kullanılmaktadır. *Lactococcus* ve *Lactobacillus* cinsine ait türler büyük bir çoğunlukla GRAS (Generally recognized as safe-genel olarak güvenli bilinen) statüsünde bulunurken, *Streptococcus* ve *Enterococcus* cinslerine ait türler ve birkaç LAB cinsi üyesi fırsatçı patojenleri içermektedir. Mevcut veriler, laktobasiller ve

bifidobakterilerle yürütülen kontrollü klinik çalışmalarda bu bakterilerin hiçbir zararlı etkilerinin saptanamadığını göstermektedir. Bağırsak mukoza tabakasının bozulması, yapılan çalışmalarda toksisitenin oluşumunu gösteren bir belirti olarak kullanılmış ve ticari probiyotik suşların mukoz tabakasının bozulmasında rollerinin olmadığı ispatlanmıştır. Bu bakteriler çok nadir olarak sindirim sistemi ve diğer enfeksiyonlarla ilişkilendirilmiş ve teknolojiye kullanılan türlerin patojen olmayıp güvenilir oldukları kabul edilmiştir (Wright vd., 2002; Gomes ve Malcata, 1999; Sanders ve Huis in't Veld, 1999; Shortt, 1999).

Laktobasil cinsi içerisinde, gram pozitif bir tür olarak bulunan *L. fermentum*, çoğunlukla fermente hayvan ve bitki maddelerinde bulunur. Anaerobik bitki maddelerinin yanı sıra birçok fermente gıdada yaygın olarak bulunur. İlk kez salyadan izole edilmiştir Probiyotik bakteriler içerisinde bulunan *L. fermentum* kadınların ürogenital enfeksiyon tedavisinde kullanılır (Dickson vd., 2005; Niedzielin vd., 2001).

Ayrıca *L. fermentum* anne sütünde bulunmaktadır. Martin vd., (2005, 2006) sağlıklı iki farklı annenin sütünden *L. fermentum* CECT5716 ve *L. salivarius* CECT5713 suşlarını izole etmişleridir.

L. fermentum zorunlu heterofermentatif laktobasillerdendir. Yani hekzozları laktik asit, asetik asit, etanol ve CO₂'ye pentozları laktik asit ve asetik aside fermente etmektedir (Kandler ve Weiss, 1986; Schleifer, 1987). *L. reuteri* ve *L. fermentum* insan gastrointestinal sisteminde bulunan en önemli heterofermentatif laktobasiller olarak tanımlanmıştır (Holzapfel ve Schilinger, 2002). *L. fermentum* süt ürünlerinde bulunan türlerden birisidir (Yaygın ve Kılıç, 1993).

Laktik asit bakterilerinin çoğunun antibiyotiklere karşı dirençli olduğu, bu direncin yapısal olduğu ve transfer edilemediği kabul edilmiştir. Bununla birlikte *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. reuteri* gibi bazı laktik asit bakterilerinin plazmitler tarafından kodlanan antibiyotik dirençlilik genleri taşıdığı, antibiyotik dirençliliğinin patojen ve patojen olmayan bakterilere transferinin probiyotiklerin güvenilirliği ve sağlık açısından büyük önem taşıdığı belirtilmiştir. Çünkü plazmitlerle taşınan antibiyotik dirençlilik özelliği gösteren suşların insan ve hayvanlarda probiyotik olarak kullanılmasının uygun olmadığı, transfer edilemeyen dirençliliğin

uygulamalarda yararlı olabildiği bildirilmiştir (Ishiwa ve Iwata, 1980; Adams ve Marteau, 1995; Fons vd., 1997; Charteris vd., 1998; Salminen vd., 1998).

2.4. Starter Kültürler

Starter kültürlerin ilk kullanımının üzerinden yaklaşık 100 yıl geçmiştir. Storch, Kopenhag'da Weigmann, Kiel'de birbirlerinden bağımsız olarak ekşi krema ve peynir altı suyundan peynir üretiminde laktik asit ve diasetil üretiminden sorumlu olan mezofilik laktik asit bakterilerini izole etmeyi başarmışlardır. Günümüzde tüm dünya ülkelerinde fermente sütler, krema olgunlaştırma ve değişik peynir çeşitlerinin üretiminde dominant olarak laktokok türleri kullanılmakta, bazı peynir çeşitleri ile süt içeceklerinin yapımında mezofilik laktobasillerden de yararlanılmaktadır. Bunlar asitlik oluşturdıkları gibi proteolitik aktif bakterilerdir. Hatta bazıları probiyotik özelliğe de sahiptir (Kılıç, 2001).

Günümüzde pek çok fermente içecek ve gıda; sebze, meyve, et ve süt gibi farklı çığ tarımsal ürünlerden elde edilmektedir. Bu ürünlerin oluşumunda LAB starter kültür olarak kullanılması gıda üretim endüstrisi açısından önemli bir aşamayı oluşturmaktadır (Lhys, 2002).

LAB, süt şekeri olan laktozun fermentasyonu sonucunda laktik asit üretmektedir. Bu reaksiyonu başlatan ve kültür ürününe önceden verilmiş olan bakteri "starter kültür" adını alır. Starter kültürler, peynir, krema, tereyağı, yoğurt benzeri birçok ürünün organoleptik dediğimiz tat, koku, güzel görünüm gibi özelliklerin oluşumunu sağlamakla birlikte, fermentasyonu da gerçekleştirirler. İyi bilinen fermentatif özelliklerinin yanı sıra pek çok alanı ilgilendiren özellikleri ile LAB, fermente ürün eldesinde starter kültür olarak kullanılarak gıda üretim aşamalarında önemli bir rol üstlenmişlerdir (Wouters vd., 2002).

Süt ürünlerinde kullanılan starter kültürler; mezofilik ve termofilik kültürler olmak üzere iki gruptur (Yaygın ve Kılıç, 1993; Mayra-Makinen ve Birget, 1998). Süt endüstrisinde yaygın olarak kullanılan mezofilik kültürler *L. lactis* subsp. *lactis*; *L. lactis* subsp. *cremoris*; *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* türleridir. Termofilik LAB'leri yoğurt ve çeşitli sert ve pişmiş peynirlerde bulunmaktadır. Birçok LAB'nin gelişemeyeceği sıcaklıklarda gelişebilen bu LAB türleri, süt

endüstrisinde yaygın olarak kullanılan termofilik starter kültürlerdir: *S. thermophilus*; *L. helveticus*; *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* veya *lactis* (Cogan ve Hill, 1993; Delcour vd., 2000).

En yaygın tüketilen süt ürünleri arasında yoğurt, peynir, tereyağı ve krema yer almaktadır (De Vuyst, 2000). Özellikle *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* ve *Pediococcus* cinslerine ait LAB'leri, bu ürünlerin üretiminde önemli rol almaktadırlar (Daly vd., 1998; Cogan, 1996).

Starter kültürler, kullanılacakları hammadde veya substrata uygun olarak seçilmektedir. Dolayısıyla süt, et, hububat ve sebze ürünleri için seçilen starterler genel olarak farklı mikroorganizmaları farklı miktarlarda içermektedir (Holzapfel, 1997; Vogelmann vd., 2009).

Gıda endüstrisinde patojen olmayan ve fermente gıda üretiminde starter kültür olarak kullanılan altı LAB cinsi bulunmaktadır: *Lactococcus* (süt), *Lactobacillus* (süt, et, sebze, hububat), *Leuconostoc* (sebze, süt), *Pediococcus* (sebze, et), *Oenococcus* (*O. oeni*, şarap) ve *Streptococcus* (*S. thermophilus*, süt) (Foulquie vd., 2006; Holzapfel, 2003).

Anne sütlerinden elde edilmiş olan *Lactobacillus* cinsi bakterilerin, bazı starter ve probiyotik özelliklerinin belirlenmesi bu çalışmanın konusunu teşkil etmektedir. Bu bağlamda “Anne Sütünden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Bazı Probiyotik ve Starter Özelliklerinin Araştırılması” (2013/70) başlıklı Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) kapsamında anne sütünden izole edilen suşlardan basil morfolojisine sahip izolatların API 50 CHL kiti ile tanımlaması yapılmış ve tanımlanan suşlar arasından yüksek tanımlama oranına sahip üç suş seçilmiştir. Bu çalışma kapsamında seçilen suşların bazı starter ve probiyotik özellikleri belirlenmiştir.

3. MALZEME ve YÖNTEM

Bu çalışma, Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi Tarım Ürünleri Geliştirme Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Bu çalışmada, “Anne Sütünden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Bazı Probiyotik ve Starter Özelliklerinin Araştırılması” (2013/70) başlıklı Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) kapsamında anne sütünden izole edilen suşlar kullanılmıştır.

3.1. İzolatların API 50 CHL Sistemiyle Tanımlanması

API 50 CHL (bioMerieux) sistemi karbonhidrat fermentasyon testleri dikkate alınarak laktik asit bakterilerinin tür düzeyinde tanımlanmasında kullanılan bir sistemdir. Test hazır olarak bulunan kitler üzerinde gerçekleştirilerek, mikroorganizmalar kullandıkları karbonhidrat kaynaklarına göre sınıflandırılmaktadır.

Gliserol stoklardan 2 pasaj olarak sıvı besiyerinde aktifleştirilen izolatlar MRS agar besiyerinde 48 saat süreyle tek koloni düşecek şekilde geliştirilmiştir. Besiyerinde geliştirilmiş olan kültürler steril öze yardımıyla 2 mL'lik API süspansiyon ortamına aktarılmıştır. 2 mL'lik API süspansiyon ortamında maksimum yoğunluk elde edildikten sonra ortam sıvısından 5 mL'lik API süspansiyon ortamına aktarım yapılmış ve bu ortamda BioMerieux Mc. Farland 2 konsantrasyonunu sağlayan sıvı miktarı tespit edilmiştir. Daha sonra 2 mL'lik API süspansiyon ortamından BioMerieux Mc. Farland 2 konsantrasyonunu sağlayan sıvı miktarının iki katı hacmi alınmış ve 10 mL API 50 CHL ortamına aktarılarak ortama homojen olarak dağılması sağlanmıştır. Elde edilen süspansiyon, her biri farklı karbon kaynağı içeren kuyucuklara sahip kitlere aktarılmıştır. Kuyucukların doldurulduktan sonra, yüzeyleri mineral yağ ile kaplanarak kapakları kapatılan kitler 37 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sürecinde 24 ve 48. saatler sonunda kuyucuklarda meydana gelen renk değişimleri göz önünde bulundurularak sonuçlar değerlendirilmiştir. Tanımlanmaya çalışılan izolatlar kuyucuklarda bulunan karbon kaynağını kullandığı

zaman mevcut indiktor nedeniyle renk değişimi meydana gelmektedir. Başlangışta koyu mavi renkte olan kuyucuklardan sarıya dönenler pozitif, değişmeden kalanlar negatif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif ve negatif olarak değerlendirilen sonuçlar apiweb™ tanımlama yazılımı ile değerlendirilerek tür tayinleri gerçekleştirilmiştir.

API 50 CHL testinde bulunan maddeler şunlardır: gliserol, eritritol, D–arabinoz, L-arabinoz, riboz, D-ksiloz, L-ksiloz, adonitol, inositol, galaktoz, glukoz, fruktoz, mannoz, sorboz, rhamnoz, dulcitol, salisin, sellobioz, maltoz, laktoz, melibioz, sukroz, trehaloz, inulin, melezitose, rafinoz, nişasta, glikojen, ksilitol, gentiobiose, D-turanoz, D- lyxose, D-tagatoz, eskulin, α -metil-D-mannosid, α -metil-Dglukozid, N-asetil-glukozamin, amigidalin, arbutin, D-arabitol, L-arabitol, glukonat, 2-keto-glukonat, 5-keto glukonat, mannitol, sorbitol, D- fukoz, L-fukoz, b-metil- D-ksilosid.

3.2. İzolatların Bazı Starter Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.1. Farklı sıcaklıklarda gelişme testi

İzolatların aktif kültürleri steril 10 mL MRS broth (52,2 g/L) sıvı besiyeri içeren tüplere inoküle edilerek 15 °C ve 45 °C'deki sıcaklıklarda anaerobik koşullarda 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bulanıklık görülen tüplerde üremenin olduğu kabul edilecek ve test pozitif, üremenin görülmediği tüplerde ise test negatif olarak değerlendirilmiştir (Lewus vd., 1991; Facklam vd., 2002).

3.2.2. Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme testi

MRS broth sıvı besiyerine % 2, % 4, % 5 ve % 6,5 oranlarında NaCl hassas terazi ile tartılarak ayrı ayrı ilave edilmiştir. NaCl oranları ayarlanan sıvı besiyerinden her cam tüpe 10 mL olacak şekilde dağıtılmış, otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Sonra M2-6, M2-24 ve M2-43 numaralı suşlar her cam tüpe % 1 oranında inoküle edilerek anaerobik koşullarda 37 °C sıcaklıkta 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda gelişim gösterenler pozitif, göstermeyenler negatif olarak kaydedilmiştir (Holt vd., 2000; Arıcı vd., 2011).

3.2.3. İzolatların asit üretme yetenekleri

MRS broth besiyeri cam tüplere 3 tekrarlı olacak şekilde 20'şer mL dağıtılmış ve otoklav ile sterilizasyon işlemi yapılmıştır. Sterilizasyon işleminden sonra M2-6, M2-24 ve M2-43 numaralı suşlar mikropipet ile her cam tüpe % 1 oranında inoküle edilmiştir. Ardından 37 °C'de anaerobik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. pH ölçümü için inkübasyona bırakılan besiyerlerinden steril koşullarda cam tüplere örnekler alınarak pH Metre ile ölçüm yapılmıştır. 3, 6, 12, 24, 36 ve 48. saatlerde pH ölçümü yapılarak sonuçlar kaydedilmiştir (Sağdıç vd., 2002).

3.2.4. Ekzopolisakkarit (EPS) üretiminin belirlenmesi

Bu amaçla Smitinont vd. (1999) tarafından kullanılan EPS ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır. Çalışma için LAB izolatları MRS broth besiyerinde 4,60 pH'ya kadar geliştirilerek yine MRS broth besiyerine % 2 oranında inoküle edilmiş ve 37 °C'de 2 gün boyunca inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyondan sonra EPS'nin ekstraksiyonu için örneklerden yaklaşık 10'ar mL alınarak santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Tüpler, örneklerde bulunan hücrelerin ayrılabilmesi amacıyla 5000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Süre sonunda hücre peleti ayrılmış, süpernatant ise EPS'nin çöktürülmesi amacıyla % 95'lik etanol ile bire beş (1/ 5) oranında karıştırılmıştır. Etil alkol ile hazırlanmış olan karışım 5000 rpm'de 20 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Bu işlem sonunda EPS pelet olarak ayrılmıştır. Santrifüjleme işlemi sonrasında tüpler tartılarak 60 °C'de kurutulmuş ve işlem sonunda kuru ağırlığı alınmıştır. Tüplerin daraları tespit edilmiş olup EPS miktarı son kütlenin başlangıçtaki hacme oranından belirlenmiş ve g/L olarak ifade edilmiştir.

3.2.5. İzolatların nisin dirençliliği

İzolatların nisine karşı gösterdikleri duyarlılık veya dirençlilikleri agar difüzyon tekniği kullanılarak Tsai ve Sandine (1987)'ye göre belirlenmiştir. Suşlar, 37 °C'de iki kez art arda sıvı besi ortamında aktifleştirilmiştir. Aktif kültürlerin optikal yoğunlukları (OD) spektrofotometre 600 nm de $0,6 \pm 0,02$ 'ye ayarlanmıştır. OD değerleri ayarlanan kültürlerden 100 µL alınıp, katı besi ortamına ilave edilmiştir.

İlave edilen kültürler besi ortamının yüzeyinde dağılımı homojen bir şekilde sağlanmıştır. Besi ortamında 0,3 cm çapındaki steril çubukla kuyular açılarak, dipleri steril aynı besi ortamı ile kaplanmıştır. 0,02 N HCl'de 10 mg/mL olacak şekilde stok Nisin çözeltisi hazırlanmıştır. Suşların nisine karşı gösterdikleri duyarlılık veya dirençliliklerini belirlemek amacıyla, 50 – 100 – 150 – 200 – 250 – 300 – 350 – 400 – 450 – 500 µg/mL'lik farklı konsantrasyonlarda nisin stokları hazırlanmıştır. Besi ortamında açılan kuyulara 30 µL stoklardan ilave edilmiştir. Petriler, 37 °C'de anaerobik koşullarda 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde farklı konsantrasyonlarda nisin içeren kuyuların etrafındaki inhibisyon zon çapları kumpas ile ölçülerek, suşların nisine karşı göstermiş oldukları duyarlılık veya dirençlilikleri tespit edilmiş ve kaydedilmiştir.

3.3. İzolatların Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi

3.3.1. İzolatların düşük pH'ya toleransının belirlenmesi

MRS Broth besiyerinin pH'sı 0,1N H₃PO₄ ilave edilerek 3,9'a ayarlanmıştır. pH'sı ayarlanan besi yeri cam tüplere 10'ar mL olacak şekilde dağıtılmış ve otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonunda sıvı besi yerlerine M2-6, M2-24 ve M2-43 numaralı suşlar mikropipet ile her cam tüpe % 1 oranında inoküle edilerek 37 °C'de anaerobik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. 24. ve 48. saatlerde sonuçlar teyit edilmiş ve kaydedilmiştir (İşleroğlu vd., 2008; Yiğit, 2009).

3.3.2. Antibiyotik duyarlılık testi

Çalışmada, ampisilin (10 µg), gentamisin (10 µg), eritromisin (15µg) ve kanamisin (30 µg), penicillin G (10 µg) türü antibiyotikler kullanılmıştır. Anne sütünden izole edilen M2-6, M2-24 ve M2-43 numaralı suşların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır.

MRS Agar (% 1,5 agar) besiyeri hazırlanarak otoklav ile sterilizasyon işlemi yapılmıştır. Sterilizasyondan sonra besiyeri 45–50 °C'ye soğutularak, 9 cm çapındaki steril plastik (tek kullanımlık) petri kutularına 15-20 mL olacak şekilde steril koşullarda dökülmüştür. Besiyeri plakları besiyerinin katılaşması için oda sıcaklığında steril koşullarda 1-1,5 saat bekletilmiştir.

M2-6, M2-24 ve M2-43 numaralı suşlar hazırlanan MRS Broth besiyerinde 37 °C’de iki kez art arda aktifleştirildikten sonra Mc Farland No: 0,5 (10^8 kob/mL) bulanıklığına ayarlanmıştır.

Hazırlanmış olan dilüsyonların her birinden 100 µL alınarak daha önceden hazırlanmış ve petrilere aktarılmış olan MRS Agar besiyerine, steril koşullar altında ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petrilere, steril koşullarda, kapakları açık biçimde 5-10 dk. süreyle bekletilerek yüzeylerinin kuruması sağlanmıştır. Ardından ticari olarak satılan ve belirlenmiş olan antibiyotik diskleri (ampisilin, gentamisin, eritromisin, kanamisin ve penisilin G) petrilere steril koşullarda, her bakteri için üçer tekrar olacak şekilde aralarında en az 1,5 cm boşluk bırakılarak yerleştirilmiştir. Disklerin yerleştirilmesi işleminden sonra petrilere 10–15 dk. süreyle bekletilmiş ve sonrasında petri kutuları 37 °C’de anaerobik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda petrilereki zon çapları kumpas ile ölçülerek sonuçlar kaydedilmiştir (Rollins ve Joseph, 2000; Halami vd., 2000).

3.3.3. Elde edilen izolatların patojen mikroorganizmalara antimikrobiyal etkisi

İzolatların insanlarda gıda veya su kaynaklı patojen olan bazı mikroorganizmalar ve bazı balık bakteriyel patojenler üzerindeki inhibitör etkisini araştırmak amacıyla M2-6, M2-24 ve M2-43 numaralı suşlar MRS Broth sıvı besiyerinde anaerobik koşullarda 37 °C’de 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Aktif kültürler 5000 rpm’de 15 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonunda oluşan berrak kısım (süpernatant) steril şartlar altında 0,22 µm’lik tek kullanımlık steril filtre ile sterilize edildi. Antimikrobiyal aktivite için seçilen test mikroorganizmaları (*Staphylococcus aureus* ATCC 29212, *Salmonella enteritidis* RSKK 171, *Candida glabrata* RSKK 04019, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Shigella sonnei* Mu:57, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Aeromonas hydrophila* ATCC 19570, *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio anguillarum* M1, *Vibrio alginolyticus*) sıvı besi ortamında aktifleştirilerek, uygun sıcaklıklarda geliştirilmiş 24 saatlik aktif kültürler % 0,875’lik serum fizyolojik çözeltisi ile 2 kez yıkanmıştır. 0,5 Mc Farland yoğunluğuna ayarlanan bakteri

süspansiyonundan katı besiyeri içeren petrilere 100 µL aktarılmıştır. Katı besiyeri üzerinde 7 mm çapındaki steril çubukla kuyular açılmıştır. Kuyuların tabanları steril agarla tekrar sıvanmış ve bu kuyulara izolatlarının mikrofiltasyona tabi tutulmuş süpernatantından 100 µL ilave edilerek 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyu çevresinde oluşan zon çapları kumpas ile ölçülmüş ve sonuçlar kaydedilmiştir (Reinheimer vd., 1990; Beyatlı vd., 2010; Toksoy, 1996).

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. İzolatların API 50 CHL Sistemiyle Tanımlanması

Anne sütünden izole edilen bakteri suşlarının karbonhidratları fermente etme durumları belirlenerek identifikasyonları yapılmıştır. API 50 striplerindeki reaksiyon sonuçlarının değerlendirilmesinde, önce renk değişimine göre +/- tanımlama çizelgeleri hazırlanmıştır. Bu çizelgeler apiweb™ tanımlama yazılımı ile değerlendirilerek, tür karşılıkları belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.1’de belirtilmiştir.

API 50 CHL sistemi ile identifikasyonu yapılan suşlardan M2-6 numaralı suşun *L. fermentum*, M2-24 numaralı suşun *L. acidophilus* ve M2-43 numaralı suşun da *L. acidophilus* olarak yüksek oranlarda belirlendiği görülmüştür (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1: M2-6, M2-24, M2-43 numaralı suşların API 50 CHL sistemi ile identifikasyonu.

Suş No	Cins Adı	Tür Adı	apiweb™ % ¹
M2-6	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>L. fermentum</i>	% 92,4
M2-24	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>L. acidophilus</i>	% 98,7
M2-43	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>L. acidophilus</i>	% 91,7

Söz konusu suşların API 50 Strep Kiti ile tanımlama görüntüleri Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’de verilmiştir.

¹: API WEB Tanımlama Sistemi %’si.



Şekil 4.1: M2-6 numaralı suşun 48 saatlik inkübasyondan sonraki API 50 strip'indeki görünümü.



Şekil 4.2: M2-24 numaralı suşun 48 saatlik inkübasyondan sonraki API 50 strip'indeki görünümü.



Şekil 4.3: M2-43 numaralı suşun 48 saatlik inkübasyondan sonraki API 50 strip'indeki görünümü.

Özgün (2009) yaptığı çalışmada 100 adet kolostrum örneğinden izole ettiği suşları API 50 CHL sistemi ile tanımlamış ve 6 *L. brevis*, 5 *L. plantarum*, 6 *L. acidophilus* ve 3 *L. casei* suşunu teşhis etmiştir.

Corsetti vd., (2001) yaptıkları çalışmada ekşi maya örneklerinden izole ettikleri 317 adet muhtemel LAB'nin % 38'ini API 50 CHL sistemi ile tanımlamıştır.

Danova vd., (2005) yaptıkları çalışma ile kımızdan izole ettikleri bakterileri API 50 CHL sistemini kullanarak *L. salivarius*, *Lactobacillus buchneri* ve *L. plantarum* olarak tanımlamışlardır.

4.2. İzolatların Bazı Starter Özelliklerinin Belirlenmesi

4.2.1. Farklı sıcaklıklarda gelişme testi

İzolatların aktif kültürleri steril 10 mL MRS broth sıvı besiyeri içeren tüplere inoküle edilerek 15 °C ve 45 °C'deki sıcaklıklarda anaerobik koşullarda 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonuçları Çizelge 4.2'de belirtilmiştir.

M2-24 ve M2-43 numaralı suşlar 15 °C sıcaklıkta zayıf gelişim gösterirken M2-6 numaralı suş gelişim göstermemiştir. 45 °C sıcaklıkta ise her üç suş gelişim göstermiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2: İzolatların farklı sıcaklıklarda gelişme testi.

SUŞ NO	15°C	45°C
M2-6	-	+
M2-24	*	+
M2-43	*	+

+: Gelişim var, -: Gelişim yok, *:Zayıf Gelişim

Bhatt vd., (2012) yaptıkları çalışmada sağlıklı anne sütünden izole edilen farklı türlerde bakterileri optimum şartlardaki besiyerlerinde 10 °C, 15 °C, 37 °C, 45 °C ve 60 °C sıcaklıklarda inkübasyona bırakıp 7 gün boyunca gelişim durumlarını incelemişlerdir. Aynı çalışmada bromokrezol pembesi kullanmışlar ve inkübasyona bırakılan besiyerlerinden rengi pembeden sarıya dönüşenleri gelişim gösteren olarak belirtmişlerdir. Çalışma sonucunda *L. fermentum* ve *Lactobacillus oris*'in 10 °C, 15 °C ve 60 °C sıcaklıklarda gelişmediğini ancak 37 °C ve 45 °C sıcaklıklarda geliştiğini belirlemişlerdir.

Yavuzdurmaz, (2007) yaptığı yüksek lisans tez çalışmasında anne sütünden izole edilen *L. fermentum* ve *L. oris*'i optimum şartlardaki besiyerlerinde 10 °C, 15 °C ve 45 °C sıcaklıklarda inkübasyona bırakarak 7 gün boyunca durumlarını incelemiş ve sonuç olarak her iki bakterinin de 10 °C ve 15 °C sıcaklıkta gelişmediğini ancak 45 °C sıcaklıkta geliştiğini belirlemiştir.

4.2.2. Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme testi

% 2, % 4, % 5 ve % 6,5 oranlarında NaCl içeren MRS Broth sıvı besiyerinde inoküle edilen ve anaerobik koşullarda 37 °C'de 48 saat süreyle inkübasyona bırakılan M2-6, M2-24 ve M2-43 numaralı suşların gelişim durumları Çizelge 4.3'te verilmiştir.

M2-6 ve M2-43 numaralı suşlar % 2, % 4, % 5 NaCl içeren sıvı besiyerinde gelişim göstermiştir. M2-24 numaralı suş ise % 2, % 4 NaCl içeren sıvı besiyerinde gelişim gösterirken, % 5 NaCl içeren sıvı besiyerinde zayıf gelişim göstermiştir. M2-6, M2-24, M2-43 numaralı suşların her üçü de % 6,5 NaCl içeren sıvı besiyerinde gelişim göstermemiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3: İzolatların farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme durumu.

SUŞ NO	% 2 NaCl	% 4 NaCl	% 5 NaCl	% 6,5 NaCl
M2-6	+	+	+	-
M2-24	+	+	*	-
M2-43	+	+	+	-

+: Gelişim var, -: Gelişim yok, *:Zayıf Gelişim

Peynir üretiminde birçok peynir çeşidinin starter olmayan mikroflorasında baskın mikroorganizmalar olarak bulunabilen ya da starter kültür olarak kullanılan heterofermentatif ve homofermentatif laktik asit bakterileri birçok peynir çeşidinin olgunlaşmasında önemli rol oynamaktadır (Hansen vd., 2001; Gerasi vd., 2003; Hynes vd., 2003; Giraffa vd., 2004; Weinrichter vd., 2004).

Aralarında *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*'inde bulunduğu birçok laktobasilin peynir üretiminde destek

kültür ya da kültür olarak kullanım alanı bulunmaktadır (Lynch vd., 1996; Palles vd., 1998; Hansen vd., 2001; Deutsch vd., 2003; Hynes vd., 2003; Banks ve Williams, 2004; Giraffa vd., 2004).

Yavuzdurmaz, (2007) yaptığı çalışmada anne sütünden izole edilen *L. fermentum* ve *L. oris*'i optimum koşullarda % 2 ve % 6,5 NaCl içeren besiyerlerinde inkübasyona bırakmış ve inkübasyon sonunda çalışmamızın sonuçlarına paralel olarak % 2 NaCl içeren ortamda her iki suşun geliştiğini ancak % 6,5 NaCl içeren ortamda her iki suşun da gelişmediğini belirlemiştir.

Bhatt vd., (2012) yaptıkları çalışmada *L. fermentum* ve *L. oris*'in optimum koşullarda % 2, % 4, % 6,5 oranında NaCl içeren besiyerlerinde gelişim testini yapmışlar ve her iki suşun da % 2 oranında NaCl içeren ortamda gelişip, % 4 ve % 6,5 oranında NaCl içeren ortamda gelişmediğini belirlemişlerdir.

4.2.3. İzolatların asit üretme yetenekleri

MRS Broth sıvı besiyerinde inoküle edilen M2-6, M2-24 ve M2-43 numaralı suşlar anaerobik koşullarda 37 °C'de inkübasyona bırakıldıktan sonra 3, 6, 12, 24, 36 ve 48. saatlerde pH ölçümü yapılmış ve Çizelge 4.4'teki sonuçlar elde edilmiştir.

MRS Broth sıvı besiyerinin pH'sı 5,8 olarak ölçülmüştür. M2-6, M2-24 ve M2-43 numaralı suşların inkübe edildiği besiyerlerindeki 3, 6, 12, 24, 36 ve 48. saatlerdeki pH ölçümleri incelendiğinde üç suşta da değerlerin giderek azaldığı görülmektedir. Dolayısıyla her üç suşta da asit üretimi gözlenmiştir. Ancak 48. saatteki pH değerleri karşılaştırıldığında en fazla asit üreten suşun M2-24 numaralı suş olduğu görülmektedir. Yine M2-43 numaralı suş da M2-24 numaralı suşa yakın oranda asit üretmiştir. Bununla birlikte M2-6 numaralı suşun asit üretimi diğer iki suşa oranla daha az gerçekleşmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4: İzolatların asit üretme yetenekleri.

SUŞ NO	3. SAAT	6. SAAT	12. SAAT	24. SAAT	36. SAAT	48. SAAT
	pH*	pH*	pH*	pH*	pH*	pH*
M2-6	5,78±0,03	5,40±0	4,34±0,03	4,33±0	4,31±0	4,28±0,02
M2-24	5,70±0	5,50±0,05	4,60±0,03	4,00±0,01	3,91±0,01	3,83±0,03
M2-43	5,73±0,01	5,67±0,01	5,09±0,03	4,34±0,07	4,04±0,02	3,99±0,01

***: Ortalama ± Standart Sapma**

Laktik asit bakterilerinin karbonhidrat kaynaklarını fermente etmeleri sonucu; laktik asit ve asetik asit gibi organik asitler üretilmekte ve ortamın pH'sı düşmektedir. Gıdalarda bulunan birçok mikroorganizma, bu üretilen organik asitlere karşı hassastır ve sonuçta laktik asit bakterilerinin düşürdüğü pH'yı da tolere edememektedirler (Okereke ve Montville, 1991).

4.2.4. Ekzopolisakkarit (EPS) üretiminin belirlenmesi

M2-6, M2-24 ve M2-43 numaralı izolatların EPS üretimlerinin belirlenmesi için bölüm 3.2.4'te anlatılan EPS ekstraksiyon yöntemi uygulanmış ve sonuçlar Çizelge 4.5'te belirtilmiştir.

M2-6 numaralı suş 4,34 g/L ile EPS üretim miktarı olan en fazla olan suş olarak belirlenmiştir. M2-24 numaralı suşun EPS üretim miktarı 4,23 g/L olarak belirlenmiştir. EPS üretim miktarı en düşük olan suş ise 3,76 g/L ile M2-43 numaralı suştur (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5: İzolatların EPS üretim miktarları.

SUŞ NO	EPS Üretim Miktarı (g/L)
M2-6	4,34
M2-24	4,23
M2-43	3,76

Ekzopolisakkaritler, uzun zincirli polisakkaritlerdir. Çoğu laktik asit bakterisi asidifikasyon, şeker metabolizmasının meydana gelmesi, mikrobiyal kontaminasyona ilave olan sınırlayıcılar gibi koruyucu etkilerinden dolayı, gıda hazırlamada kullanılmaktadır. Laktik asit bakterilerinin EPS ürettikleri de bilinmektedir. EPS'ler

yoğunlaştırıcı özellik sağlamalarının yanında süt ürünlerinin yapısını geliştirmek için de önemli bir faktördür (Hugenholtz vd., 2000; Faber vd., 2001; Jolly ve Stingle, 2001; Marshall vd., 2001).

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS'ler yeni ürünlerin gelişimi için önemli polimerlerdir. EPS'nin üzerindeki yoğunluk insan sağlığını koruma özelliği, anti tümör, anti ülser ya da kolesterol düşürücü özellikleri nedeniyle artmıştır. EPS üretimi türden türe farklılık göstermekte, hatta suşlar arasında bile farklılık görülmektedir. Mikroorganizmaların salgıladıkları EPS molekülleri fagositoz ve faj ataklarına, antibiyotiklere, toksik maddelere, ozmotik strese karşı hücreleri korumaktadır (Cerning ve Bouiillanne, 1992; Nakajima vd., 1992; Nagaoka vd., 1994).

EPS'ler bakterinin olumsuz çevre şartlarından korunmasını ve çeşitli yüzeylere tutunmasını sağlamaktadır. EPS'nin bakteriyi koruma özelliği ayrıca antibiyotiklere karşıda fiziksel bir koruyuculuk şeklinde de ortaya çıkmaktadır. Bakteriler tarafından polisakkaritler katabolize edilemediklerinden enerji kaynağı değildirler, buna karşılık mikroorganizmayı veya ortamı kurumaya karşı korur, zararlı veya düşman bir ortamdan uzaklaştırırlar (Kanmani vd., 2013; Darılmaz vd., 2011)

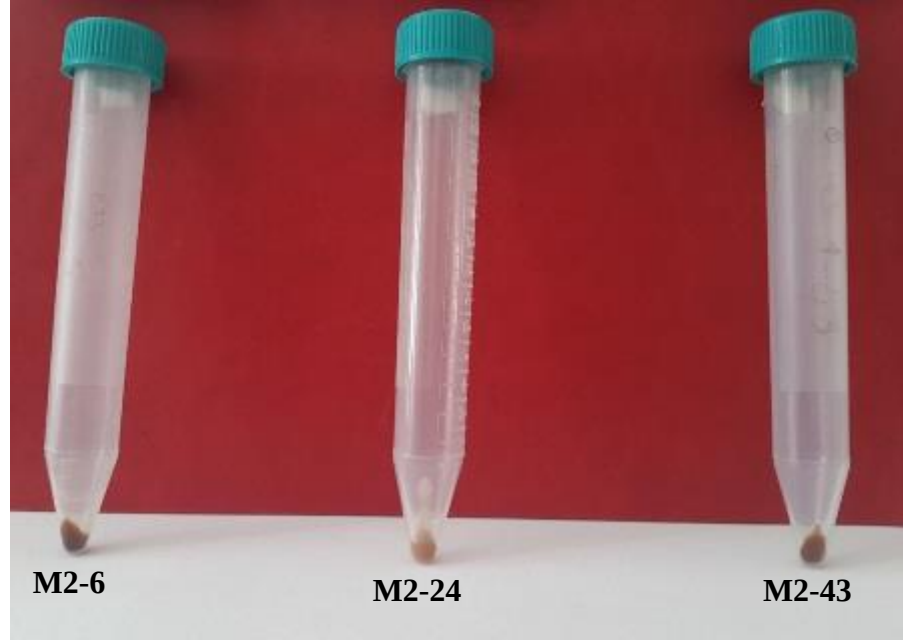
EPS üreten laktik asit bakterilerinin büyük bir çoğunluğu *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* türlerine aittir. EPS üretimi için çok sayıdaki laktik asit bakterisi incelenmiştir. Bu çalışmalarda daha çok teknolojik özelliklerinden dolayı *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *S. thermophilus* gibi termofilik türler incelenmiştir. Bununla birlikte günümüzde *L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. rhamnosus* gibi mezofilik bakteriler tarafından üretilen EPS'lere karşı ilgi de artmaktadır (Madiedo ve Reyes–Gavilan, 2005).

Duboc ve Mollet, (2001) yaptığı çalışmada *S. salivarius* ssp. *thermophilus*'un 3 g/L, *L. casei*'nin 0,49 g/L, *L. lactis* ssp. *cremoris*'in 0,6 g/L, ve *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*'un ise 2,1 g/L ekzopolisakkarit ürettiği tespit edilmiştir. Bu değerler dikkate alındığında çalışmamızda kullanılan suşların EPS üretim miktarları, birçok LAB'nden daha yüksek bulunmuştur.

S. thermophilus'un EPS miktarı 0,03 g/ L gibi düşük miktarlardan (Cerning vd., 1988) 0,89g/L'ye kadar (Escalante vd., 1998) ve *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*'un

EPS miktarı da 0,06-0,15 g/L arasında değişmektedir (Cerning, 1995; Cerning vd., 1986).

İzolatların EPS üretimleri ile ilgili şekil aşağıda verilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: İzolatların EPS üretim miktarları.

4.2.5. İzolatların nisin dirençliliği

İzolatların nisine karşı gösterdikleri duyarlılık ve dirençliliği belirlemek amacıyla bölüm 3.2.5'te anlatılan yöntemle hazırlanan besiyerlerindeki kuyulara 50 – 100 – 150 – 200 – 250 – 300 – 350 – 400 – 450 - 500 $\mu\text{g/mL}$ 'lik farklı konsantrasyonlarda nisin çözeltilerinden her kuyuya 30 μL olacak şekilde ilave edildikten sonra 37 °C'de anaerobik koşullarda 48 saat inkübasyona bırakılmış ve kuyuların etrafındaki ölçülen zon çapları Çizelge 4.6'da belirtilmiştir.

M2-6 numaralı suş tüm konsantrasyon değerlerinde nisine dirençlilik göstermiştir. M2-24 numaralı suş 50 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında, M2-43 numaralı suş ise 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında nisine dirençlilik göstermiştir. M2-24 numaralı suşun bulunduğu petrilerde 150 $\mu\text{g/mL}$ 'den 500 $\mu\text{g/mL}$ 'ye kadar artan nisin konsantrasyonlarına uyumlu şekilde zon çaplarının arttığı görülmüştür. Benzer şekilde M2-43 numaralı suşun bulunduğu petrilerde ise 250 $\mu\text{g/mL}$ 'den 500 $\mu\text{g/mL}$ 'ye kadar artan nisin konsantrasyonlarına uyumlu bir şekilde zon çaplarının

arttığı görülmüştür. Sonuç olarak tüm suşlar farklı konsantrasyonlarda nisine karşı dirençlilik göstermiştir. Ancak test edilen tüm nisin konsantrasyonlarına karşı M2-6 numaralı suş dirençli olup M2-24 ve M2-43 numaralı suşlar nisinin düşük konsantrasyonlarına direnç gösterirken artan konsantrasyonlarda hassasiyet göstermiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6: İzolatların nisine karşı gösterdikleri duyarlılık veya dirençlilikleri.

SUŞ NO	50 µg/mL Zon Çapı* (mm)	100 µg/mL Zon Çapı* (mm)	150 µg/mL Zon Çapı* (mm)	200 µg/mL Zon Çapı* (mm)	250 µg/mL Zon Çapı* (mm)	300 µg/mL Zon Çapı* (mm)	350 µg/mL Zon Çapı* (mm)	400 µg/mL Zon Çapı* (mm)	450 µg/mL Zon Çapı* (mm)	500 µg/mL Zon Çapı* (mm)
M2-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-24	-	-	3,72±0,03	3,95±0,10	3,98±0,28	5,20±0,86	7,13±0,81	7,32±0,48	7,58±0,65	8,44±0,10
M2-43	-	-	-	-	3,47±0,07	4,96±0,68	5,84±0,03	5,88±0,40	5,96±0,48	6,73±0,16

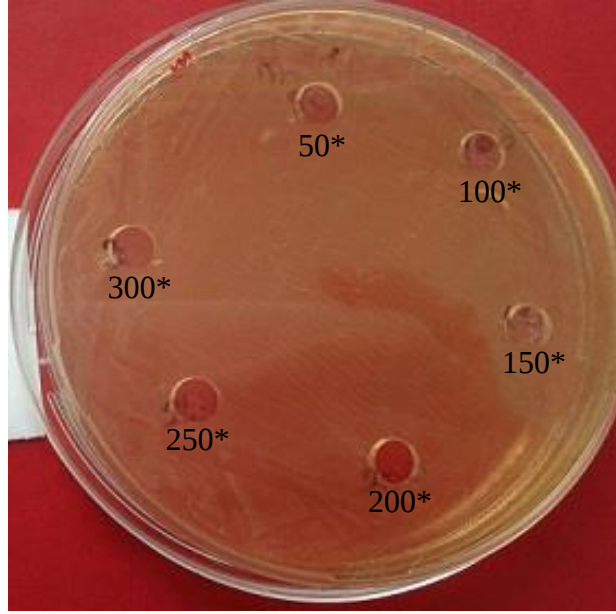
*: Ortalama ± Standart Sapma

-: Zon yok

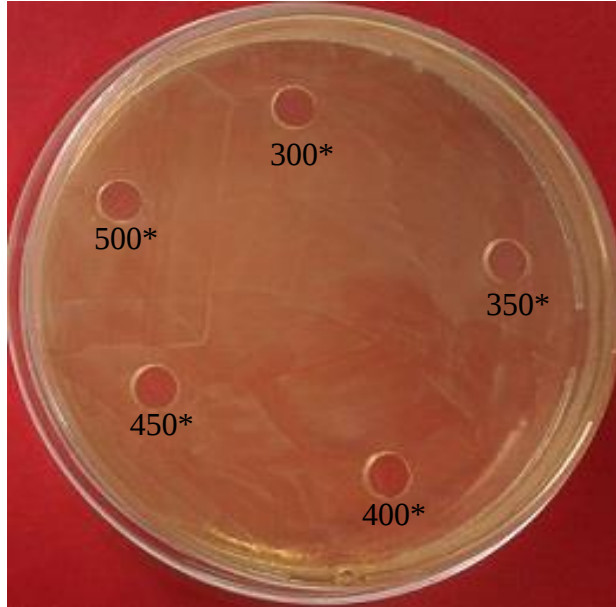
Günümüzde gıdaların raf ömrünü uzatabilmek için çeşitli gıda katkı maddeleri kullanılmaktadır. FDA onaylı olmalarına rağmen yapılan son çalışmalarda tüketici sağlığında çeşitli problemlere neden oldukları belirlenmiştir. Çoğu kimyasal madde kökenli olan koruyucular insanlarda astım, damar problemleri gibi hastalıklara sebep olmaktadır. Bu nedenle WHO tarafından belirlenen gıdalara yönelmişlerdir. Kimyasal gıda katkı maddelerine alternatif olarak doğal koruyucular tercih edilmeye başlanmıştır. Bu koruyucuların memeliler üzerinde herhangi bir yan etkisinin bulunmadığı kanıtlanmıştır. Çünkü; protein yapısında olan bu maddeler, sindirim sistemindeki proteinleri hidrolize eden enzimler tarafından parçalanmaktadır. Dolayısıyla uygun olan bakteriyosin ya da bakteriyosin üreten LAB'nin gıdalara eklenmesi hem raf ömrünü uzatacak hem de sağlıklı kabul edilecektir. En iyi bilinen bakteriyosin nisin olup; *L. lactis* tarafından üretilmektedir ve gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadır (Teuber, 1995).

Nisin molekülü; aralarında *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium* ve *Listeria* suşlarının da olduğu birçok türe karşı aktivite gösteren, protein yapısında, antibakteriyel aktiviteye ve geniş etki spektrumuna sahip bir bakteriyosindir. Nisin molekülleri; *S. aureus*, *L. monocytogenes* ve *Clostridium botulinum*'un da dahil olduğu Gram pozitif mikroorganizmalar ve pek çok asidik gıda üzerinde oldukça aktiftirler (Hansen, 1994).

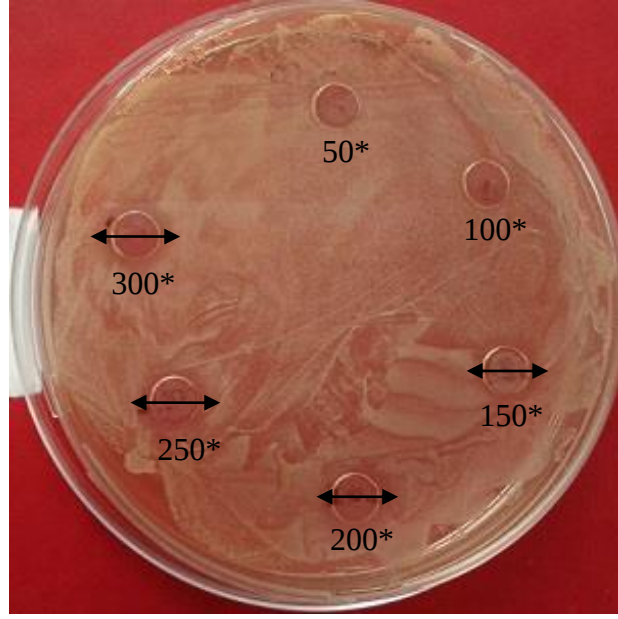
İzolatların nisin dirençliliğine ait şekiller aşağıda verilmiştir (Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10).



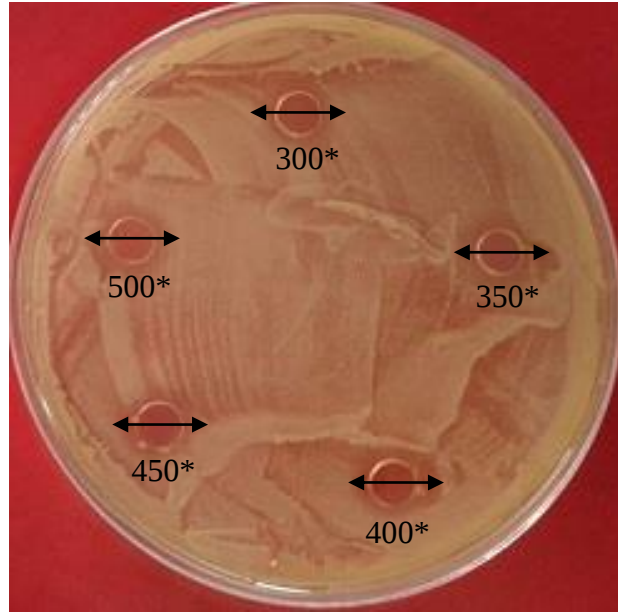
Şekil 4.5: M2-6 numaralı suşun 50, 100, 150, 200, 250, 300 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlardaki nisine dirençliliği.
*: $\mu\text{g/mL}$



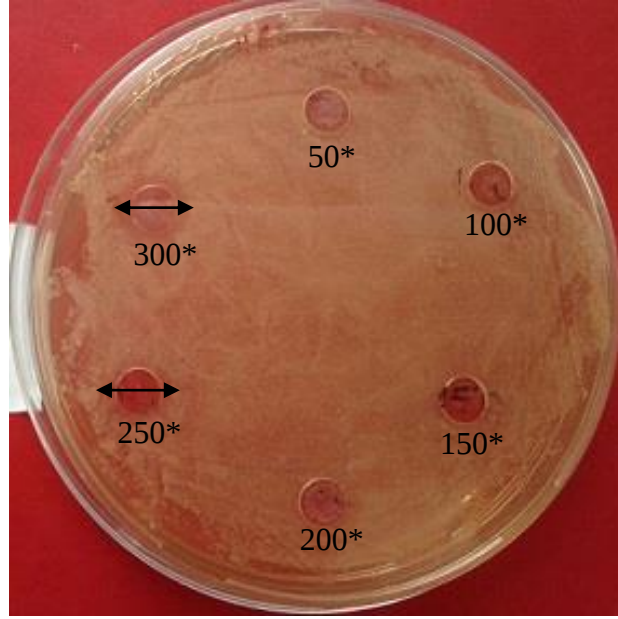
Şekil 4.6: M2-6 numaralı suşun 300, 350, 400, 450, 500 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlardaki nisine dirençliliği.
*: $\mu\text{g/mL}$



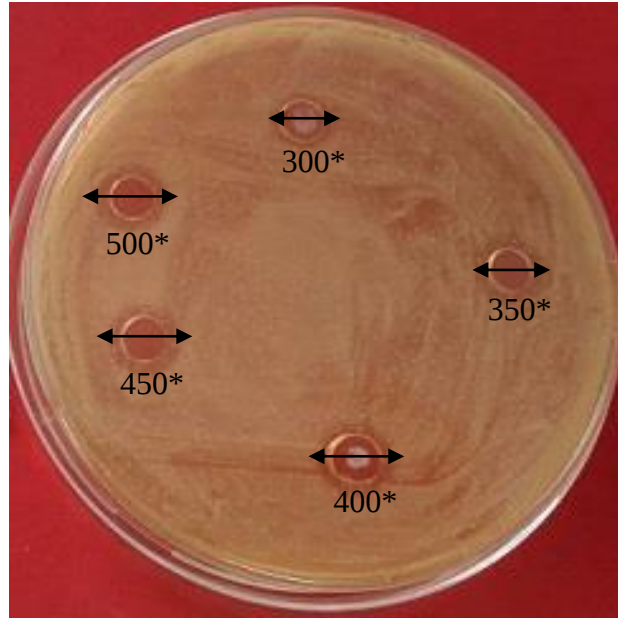
Şekil 4.7: M2-24 numaralı suşun 50, 100, 150, 200, 250, 300 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlardaki nisine dirençliliği.
*: $\mu\text{g/mL}$



Şekil 4.8: M2-24 numaralı suşun 300, 350, 400, 450, 500 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlardaki nisine dirençliliği.
*: $\mu\text{g/mL}$



Şekil 4.9: M2-43 numaralı suşun 50, 100, 150, 200, 250, 300 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlardaki nisine dirençliliği.
*: $\mu\text{g/mL}$



Şekil 4.10: M2-24 numaralı suşun 300, 350, 400, 450, 500 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlardaki nisine dirençliliği.
*: $\mu\text{g/mL}$

4.3. İzolatların Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi

4.3.1. İzolatların düşük pH'ya toleransının belirlenmesi

pH'sı 3,9'a ayarlanmış besiyerlerinde inoküle edilen M2-6, M2-24 ve M2-43 numaralı suşlar 37 °C'de anaerobik koşullarda inkübasyona bırakıldıktan sonra 24. ve 48. saatlerdeki sonuçlar Çizelge 4.7'de belirtilmiştir.

M2-6 ve M2-43 numaralı suşlar pH=3,9'da gelişim göstermişler, ancak M2-24 numaralı suş zayıf gelişim göstermiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7: İzolatların pH=3,9'da gelişimleri.

SUŞ NO	pH=3,9	
	24. Saat	48. Saat
M2-6	+	+
M2-24	*	*
M2-43	+	+

+: Gelişim var, -: Gelişim yok, *:Zayıf Gelişim

Bir mikroorganizmanın probiyotik özellik gösterebilmesi için intestinal sistemde ve endüstriyel işlemler sırasında canlı kalması gerekmektedir. Ağız yolu ile alınan probiyotiklerin intestinal sistemde fayda sağlayabilmeleri için, bağırsağa ulaşmadan önce midenin asit ortamından (pH 1,5-3,0) canlı olarak geçebilmeleri gerekmektedir. Bu nedenle probiyotik mikroorganizma seçiminde ilk aranması gereken kriter suşların asit dirençleridir (Dunne vd., 1999; Fernandez vd., 2003).

Charteris vd., (1998) yaptıkları araştırmada; gastrik ortamda pH 2'de, sadece bir laktobasil suşunun (*L. fermentum* KLD) dirençli olduğunu ancak, ortama süt proteinleri katılarak yapılan denemede ise *L. casei* 2123 ve *B. infantis* 25962 suşlarının %100 geçiş toleransı olduğunu belirlemişlerdir.

Fernandez vd., (2003) bağırsak sıvılarına dayanım açısından *L. acidophilus*'un *L. gasseri*'ye kıyasla daha dayanıklı olduğunu belirlemişlerdir. Yaptıkları çalışmada *L. acidophilus* ve *L. gasseri*'nin mide pH'sında (2-2,5) en az 90 dakika canlı kalabildiklerini, bu sürenin bağırsağın aktif bölgelerine ulaşmak için yeterli olduğunu belirtmişlerdir.

4.3.2. Antibiyotik duyarlılık testi

MRS Agar besiyerine Mc Farland No: 0,5 (10^8 kob/mL) bulanıklığına ayarlanan M2-6, M2-24 ve M2-43 numaralı suşlar inoküle edilip besiyerlerine antibiyotik diskler yerleştirilmiş, 37 °C’de 24 saat sonra diskler etrafındaki zonlar ölçülmüş ve sonuçlar Çizelge 4.8’de belirtilmiştir.

Ampicillin ve penicillin G her üç bakterinin gelişimini inhibe etmiş ve petri kutularında geniş çaplı zonlar oluşturmuştur. Ampicillin ve penicillin G kadar etkili olmasa da erythromycin antibiyotiği de petri kutularında geniş zonlar oluşturarak aktivite göstermiştir. Gentamicin sadece M2-6 numaralı suşun bulunduğu petride küçük çaplı zonlar oluşturmuş, M2-24 ve M2-43 numaralı suşların bulunduğu petrilere zon oluşumu gözlenmemiştir. Kanamycin üç suşun bulunduğu petrilere de aktivite göstermemiştir. Yani tüm suşların kanamycine, M2-24 ve M2-43 numaralı suşların ise gentamicine dirençli olduğu; M2-6 suşunun gentamicine duyarlı olduğu ve tüm suşların ampicillin, erythromycin ve penicillin G’ye duyarlı oldukları belirlenmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8: İzolatların antibiyotik duyarlılık testi zon çapları.

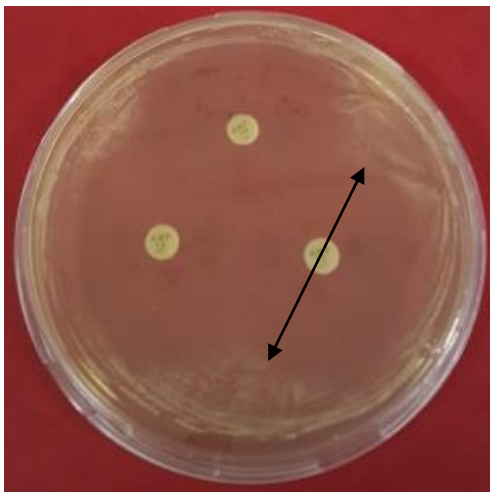
Suş No	Ampicillin Zon Çapı* (mm)	Gentamicin Zon Çapı* (mm)	Erythromycin Zon Çapı* (mm)	Kanamycin Zon Çapı* (mm)	Penicillin G Zon Çapı* (mm)
M2-6	37,31±0,34	8,17±0,32	24,57±1,04	-	37,71±2,15
M2-24	34,93±1,57	-	33,11±0,31	-	50,85±0,46
M2-43	38,52±3,79	-	35,95±2,26	-	37,86±1,89

-: Zon yok

Sönmez vd., (1999) tavuk bağırsaklarından izole ettikleri 3 adet *L. acidophilus*, 5 adet *L. agilis*, 2 adet *L. animalis*, 2 adet *L. brevis*, 2 adet *Lactobacillus coryneformis* subsp. *torquens*, 9 adet *L. fermentum* ve 17 adet *L. plantarum* olmak üzere toplam 40 izolatın antibiyotik dirençliliklerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda laktobasil suşlarının penisilin grubu antibiyotiklerden amoksisilin, ampisilin ve karbenisiline % 100, penisiline % 97.5, oksasiline % 70, metisiline % 35 oranında duyarlı olduklarını tespit etmişlerdir. Buna karşın, kloramfenikol % 92.5, tetrasiklin % 85,

makrolidlerden eritromisin % 85 ve rifampisin % 82,5 değerleriyle laktobasillere yüksek düzeyde etkili diğer antibiyotikleri oluşturmuşlardır. Ancak aminoglikozidlere (kanamisin, gentamisin, neomisin, streptomisin) karşı suşların % 50'den fazlası direnç göstermiştir. Linkomisin, nistatin, spektinomisin ve peptid grubu antibiyotiklerden basitrasine dirençli suşların oranı ise % 60-90 arasında değişmiştir. Yine peptid grubu antibiyotiklerden polimiksin B'ye karşı suşların % 100'ü dirençli bulunmuştur.

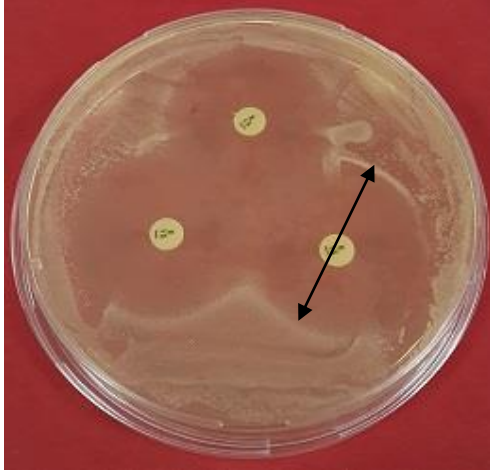
LAB'nin çoğunun antibiyotiklere karşı dirençli olmakla beraber bu direncin transferinin mümkün olmadığı kabul edilmiş; ancak *L. fermentum*, *L. plantarum* ve *L. reuteri* gibi bazı LAB'nin plazmitler tarafından kodlanan antibiyotik dirençlilik genleri taşıdığı ve antibiyotik dirençliliğinin patojen ya da patojen olmayan bakterilere transferinin son derece önemli olduğu belirtilmiştir. Çünkü plazmitlerle taşınan antibiyotik dirençlilik özelliği gösteren suşların insan ve hayvanlarda probiyotik olarak kullanılmasının uygun olmadığını, transfer edilemeyen dirençliliğin uygulamalarda yararlı olabildiği bildirilmiştir (Ishiwa ve Iwata, 1980; Adams ve Marteau, 1995; Fons vd., 1997; Charteris vd., 1998; Salminen vd., 1998). Antibiyotik duyarlılık testine ait şekiller aşağıda verilmiştir (Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25).



Şekil 4.11: M2-6 numaralı suşun ampicilline karşı antibiyotik duyarlılık testi.



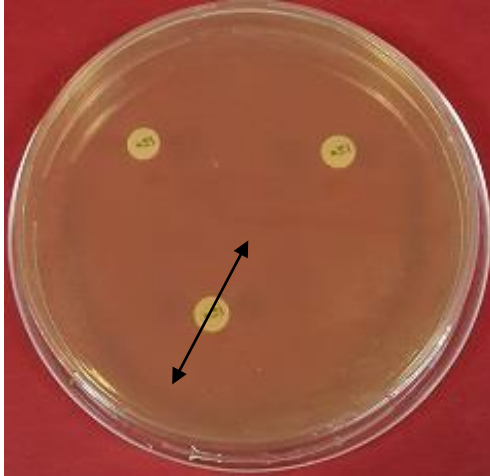
Şekil 4.12: M2-6 numaralı suşun gentamicine karşı antibiyotik duyarlılık testi.



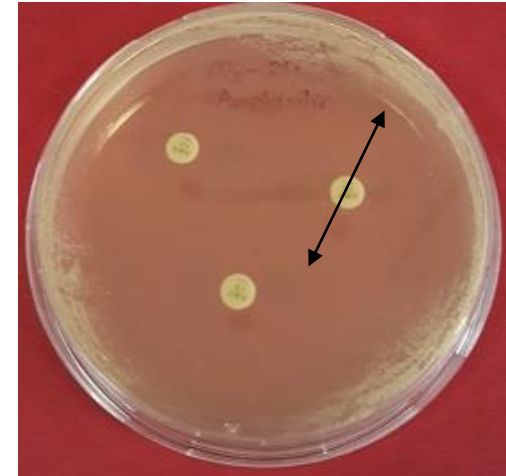
Şekil 4.13: M2-6 numaralı suşun erythromycine karşı antibiyotik duyarlılık testi.



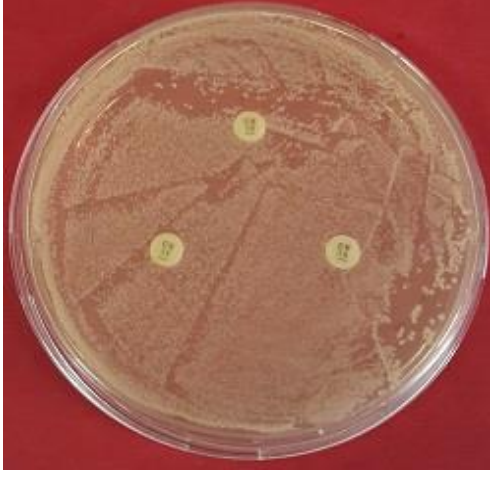
Şekil 4.14: M2-6 numaralı suşun kanamycine karşı antibiyotik duyarlılık testi.



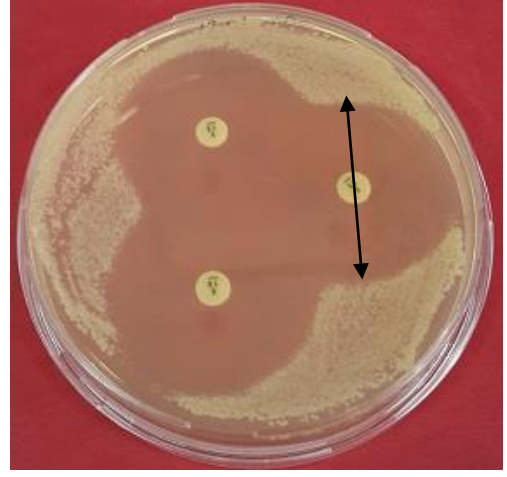
Şekil 4.15: M2-6 numaralı suşun penicillin G'ye karşı antibiyotik duyarlılık testi.



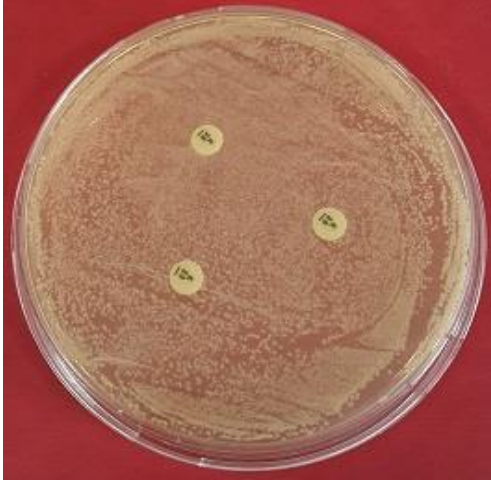
Şekil 4.16: M2-24 numaralı suşun ampicilline karşı antibiyotik duyarlılık testi.



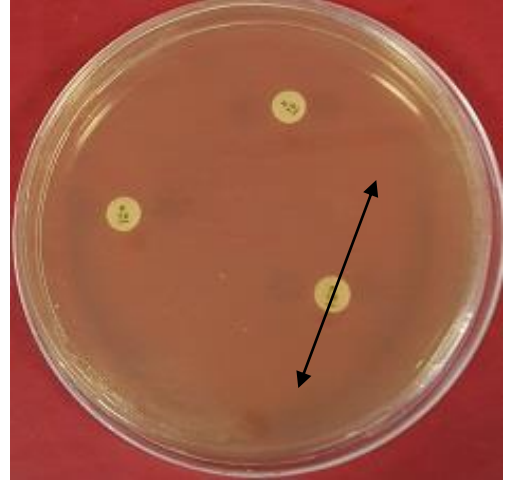
Şekil 4.17: M2-24 numaralı suşun gentamicine karşı antibiyotik duyarlılık testi.



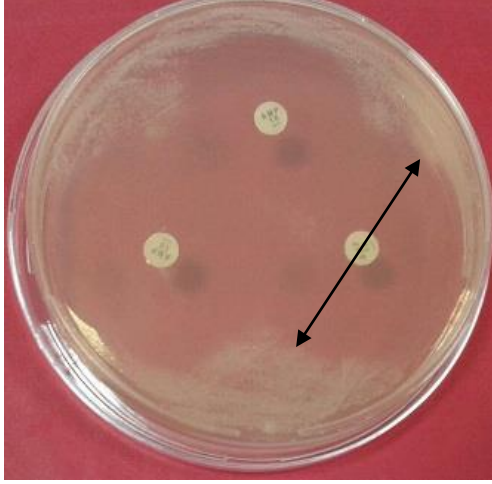
Şekil 4.18: M2-24 numaralı suşun erythromycine karşı antibiyotik duyarlılık testi.



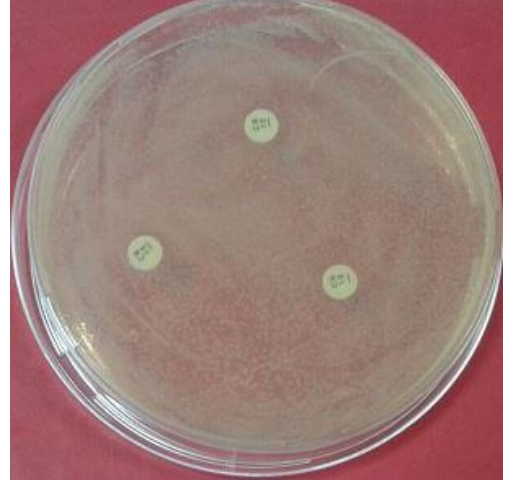
Şekil 4.19: M2-24 numaralı suşun kanamycine karşı antibiyotik duyarlılık testi.



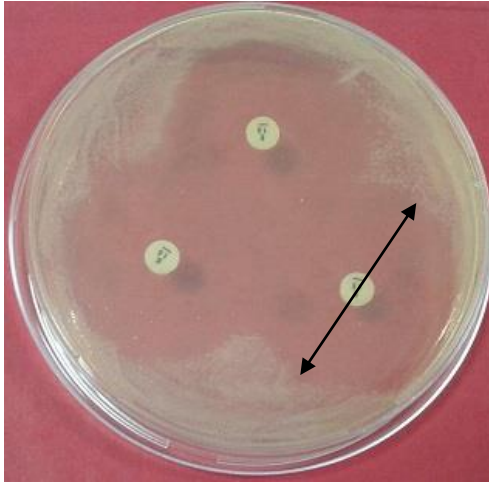
Şekil 4.20: M2-24 numaralı suşun penicillin G'ye karşı antibiyotik duyarlılık testi.



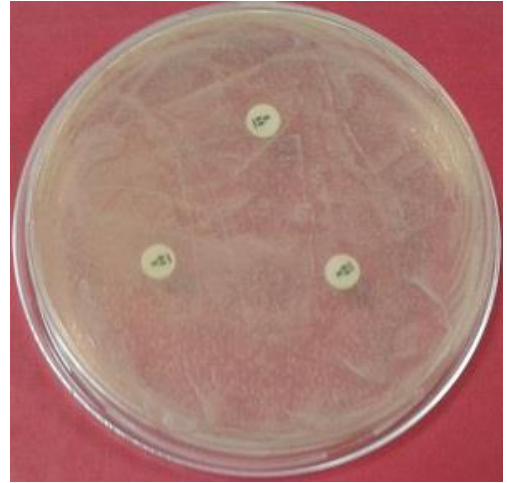
Şekil 4.21: M2-43 numaralı suşun ampicilline karşı antibiyotik duyarlılık testi.



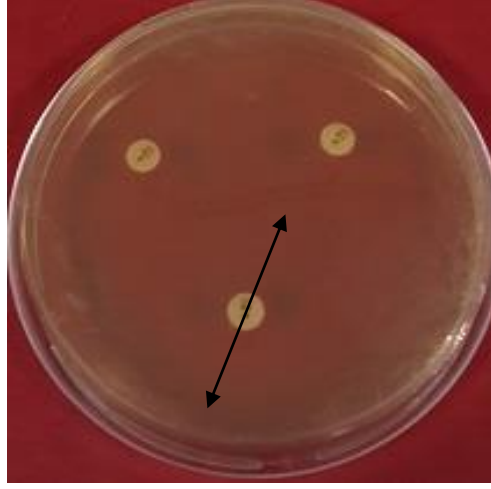
Şekil 4.22: M2-43 numaralı suşun gentamicine karşı antibiyotik duyarlılık testi.



Şekil 4.23: M2-43 numaralı suşun erythromycine karşı antibiyotik duyarlılık testi.



Şekil 4.24: M2-43 numaralı suşun kanamycine karşı antibiyotik duyarlılık testi.



Şekil 4.25: M2-43 numaralı suşun penicillin G'ye karşı antibiyotik duyarlılık testi.

4.3.3. Elde edilen izolatların patojen mikroorganizmalara antimikrobiyal etkisi

M2-6, M2-24 ve M2-43 numaralı suşların bölüm 2.3.3'de anlatılan yöntemle antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek için (*S. aureus* ATCC 29212, *S. enteritidis* RSKK 171, *C. glabrata* RSKK 04019, *C. albicans* ATCC 10231, *E. coli* O157:H7, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 35218, *S. enteritidis* ATCC 13076, *S. sonnei* Mu:57, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *A. hydrophila* ATCC 19570, *L. garvieae*, *Y. ruckeri*, *V. anguillarum* M1, *V. alginolyticus*) test mikroorganizmaları kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10'da belirtilmiştir.

M2-6 numaralı suşun insan patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite göstermediği belirlenmiştir. Zon çapları dikkate alındığında M2-24 numaralı suş *S. aureus* ATCC 29212, *S. enteritidis* RSKK 171, *C. glabrata* RSKK 04019, *C. albicans* ATCC 10231, *E. coli* O157:H7, *E. coli* ATCC 35218 ve *S. sonnei* Mu:57'ye karşı M2-43 numaralı suşa kıyasla antimikrobiyal aktivitesi daha yüksek olmuştur. Bununla birlikte M2-43 numaralı suş, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. enteritidis* ATCC 13076 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644'e karşı M2-24 numaralı suşa kıyasla antimikrobiyal aktivitesi daha yüksek olmuştur. Denenen tüm test mikroorganizmaları içerisinde en yüksek inhibisyon zonuna *E. coli* O157:H7'ye

karşı M2-24 ($12,41 \pm 1,46 \text{mm}$) numaralı suşun sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9: İzolatların insan patojen mikroorganizmalara antimikrobiyal etkisi.

Suş No	<i>S. aureus</i> ATCC 29212	<i>S. enteritidis</i> RSKK 171	<i>C. glabrata</i> RSKK 04019	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	<i>S. sonnei</i> Mu:57	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644
	Zon Çapı* (mm)	Zon Çapı* (mm)	Zon Çapı* (mm)	Zon Çapı* (mm)	Zon Çapı* (mm)	Zon Çapı* (mm)	Zon Çapı* (mm)	Zon Çapı* (mm)	Zon Çapı* (mm)	Zon Çapı* (mm)
M2-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M2-24	10,61±1,39	8,79±0,95	10,21±1,84	6,80±0,50	12,41±1,46	8,79±0,95	11,31±0,29	8,46±1,02	10,33±0,26	4,44±0,14
M2-43	6,45±0,77	7,59±1,29	7,59±0,65	6,45±0,65	10,51±0,85	10,50±0,42	9,66±0,35	10,46±0,77	10,05±1,02	5,91±0,81

*: Ortalama ± Standart Sapma

-: İnhibisyon zonu yok

Test edilen insan patojen mikroorganizmalar üzerinde etkili olmayan M2-6 numaralı suş balık patojenleri içerisinde sadece *A. hydrophila* ATCC 19570'e karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Bununla beraber M2-43 numaralı suş *A. hydrophila*'ya karşı en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi gösteren suş olmuştur. Üç suş içerisinde *A. hydrophila*'ya karşı en düşük antimikrobiyal aktiviteyi M2-24 numaralı suş gerçekleştirmiştir. M2-24 numaralı suş *L. garvieae* ve *Y. ruckeri*'ye karşı antimikrobiyal aktivite gösterirken, aynı test bakterileri üzerinde M2-6 ve M2-43 numaralı suşlar antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. M2-43 numaralı suşun *V. anguillarum* M1'e karşı M2-24'e kıyasla antimikrobiyal aktivitesi daha yüksek olmuştur. Ancak M2-6 numaralı suşun *V. anguillarum* M1'e karşı antimikrobiyal aktivite göstermediği belirlenmiştir. *V. alginolyticus*'e karşı her üç suşun da antimikrobiyal aktivite göstermediği belirlenmiştir. Denenen tüm test mikroorganizmaları içerisinde en yüksek inhibisyon zonuna *A. hydrophila* ATCC 19570'e karşı M2-43 numaralı suşun ($16,76 \pm 0,94$ mm) sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10: İzolatların balık patojen mikroorganizmalara antimikrobiyal etkisi.

Suş No	<i>A. hydrophila</i> ATCC 19570	<i>L. garvieae</i>	<i>Y. ruckeri</i>	<i>V. anguillarum</i> M1	<i>V. alginolyticus</i>
	Zon Çapı* (mm)	Zon Çapı* (mm)	Zon Çapı* (mm)	Zon Çapı* (mm)	Zon Çapı* (mm)
M2-6	12,44±1,05	-	-	-	-
M2-24	8,89±0,42	5,96±0,90	4,43±0,53	6,28±0,83	-
M2-43	16,76±0,94	-	-	7,20±0,96	-

*: Ortalama ± Standart Sapma

-: İnhibisyon zonu yok

M2-24 numaralı suş, insan ve balık patojenlerinden *V. alginolyticus* hariç tüm mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Aynı suş antibiyotik duyarlılık testinde penicillin G'ye en duyarlı suş olurken, ampicillin ve erythromycine karşı diğer suşlara kıyasla daha az duyarlıdır. Kanamycin ve gentamicine karşı ise dirençlidir.

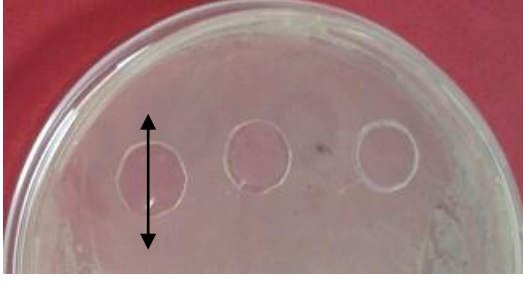
Probiyotik suşların antimikrobiyal aktivite göstermesi son yıllarda akut ya da kronik hastalıkların tedavisi ya da önlenmesinde giderek artan ilaç kullanımına özellikle de antibiyotiklerin kullanımına alternatif olarak probiyotik kullanım potansiyelini arttırmaktadır. Antibiyotikler kullanıldığında hastalıkların tedavisiyle birlikte vücutta birçok yan etki ortaya çıkmakta, ayrıca antibiyotikler vücuttaki patojen mikroorganizmaları inhibe ederken aynı zamanda yararlı mikroorganizmalara da zarar vererek ya da onları inhibe ederek vücudun özellikle de intestinal sistemin doğal mikroflora dengesini bozmaktadır. Dolayısıyla hastalıkları tedavi ya da önlemede antibiyotik yerine probiyotikler kullanıldığında hem vücuttaki yan etkiler ortaya çıkmayacak hem de vücudun doğal mikroflora dengesi korunmuş olacaktır.

Yapılan bir çalışmada Pecorino del Poro peynirinden toplam 225 laktik asit bakterisi izole edilmiş, bunlardan 18 tanesinin *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal aktivitesini incelenmiş ve 9 laktobasilin antimikrobiyal aktivitesini belirlenmiştir. Çalışmada *L. paracasei* ssp. *paracasei* ve *Lactobacillus curvatus*'un *E. coli*'ye karşı yoğun bir antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Caridi, 2003).

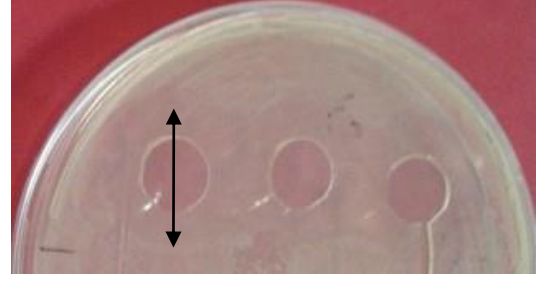
Mehrnia vd., (2014) yaptıkları çalışmada anne sütü ile beslenen bebeklerin dışkılarından izole ettikleri *Lactobacillus* türü bakterilerin *E. coli* ATCC 11229, *S. aureus* ATCC 25923, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella typhimurium* CCM 5445 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktiviteleri agar difüzyon yöntemine göre belirlemişler ve Laktobasil suşlarının tamamının *S. enteritidis* ATCC 13076, *S. typhimurium* CCM5445 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. İzole ettikleri *L. fermentum* LB16 suşunun *S. aureus* hariç tüm test bakterileri üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Çalışmamızda API 50 CHL sistemiyle yüksek oranda *L. fermentum* olarak tanımladığımız M2-6 numaralı suş, test mikroorganizmaları üzerinde *A. hydrophila* ATCC 19570 antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. Dolayısıyla aynı türün farklı suşlarının aynı test mikroorganizmaları (*L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. enteritidis* ATCC 13076, *P. aeruginosa* ATCC 27853) üzerinde antimikrobiyal aktiviteleri farklılık göstermektedir. Aynı çalışmada *L. casei*'nin farklı suşlarının

aynı test mikroorganizmaları üzerinde antimikrobiyal aktivitesinin farklılıklar gösterdiği görülmektedir.

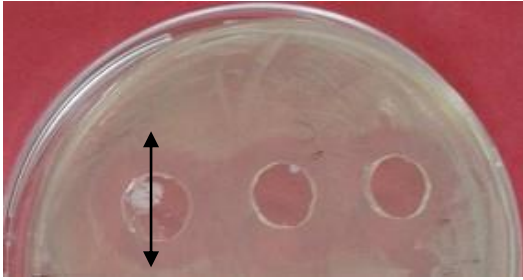
İzolatların insan patojen mikroorganizmalara antimikrobiyal etkisi ile ilgili şekiller aşağıda verilmiştir (Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29, Şekil 4.30, Şekil 4.31, Şekil 4.32, Şekil 4.33, Şekil 4.34, Şekil 4.35, Şekil 4.36, Şekil 4.37).



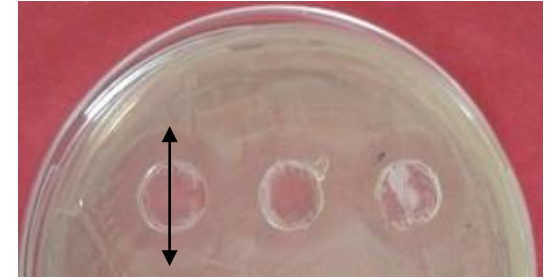
Şekil 4.26: M2-24 numaralı suşun *S. aureus* ATCC 29212 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi.



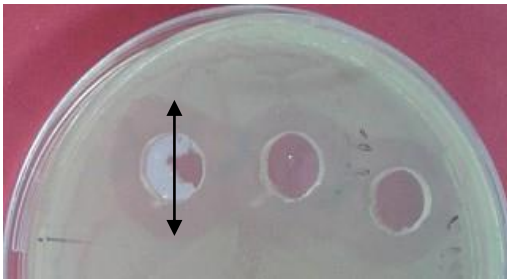
Şekil 4.27: M2-43 numaralı suşun *S. aureus* ATCC 29212 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi.



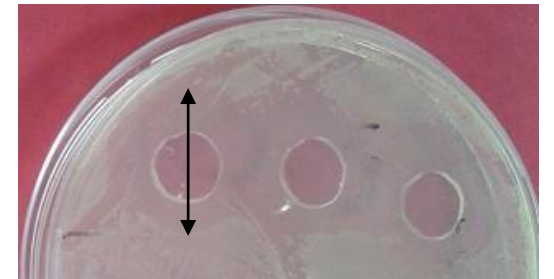
Şekil 4.28: M2-24 numaralı suşun *S. enteritidis* RSKK 171 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi.



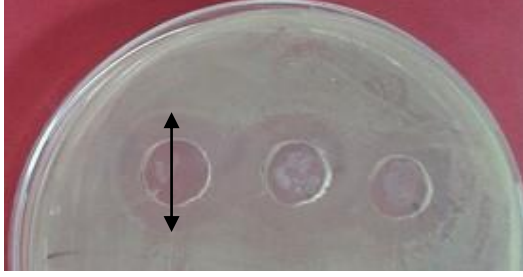
Şekil 4.29: M2-43 numaralı suşun *S. enteritidis* RSKK 171 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi.



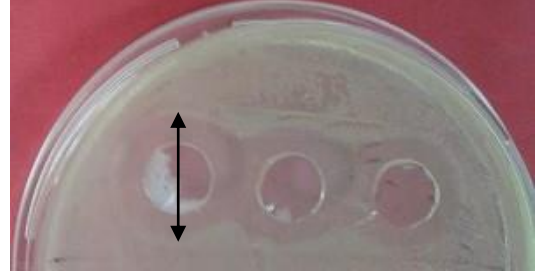
Şekil 4.30: M2-24 numaralı suşun *E. coli* O157:H7 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi.



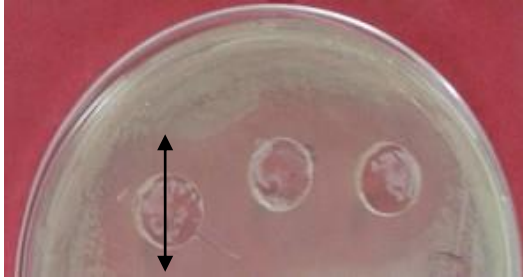
Şekil 4.31: M2-43 numaralı suşun *E. coli* O157:H7 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi.



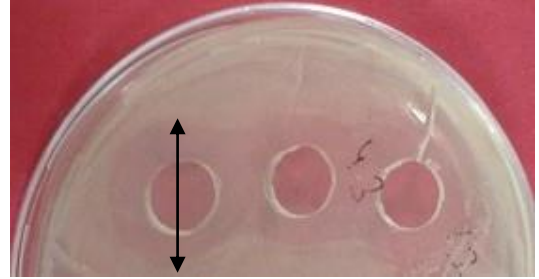
Şekil 4.32: M2-24 numaralı suşun *E. coli* ATCC 35218 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi.



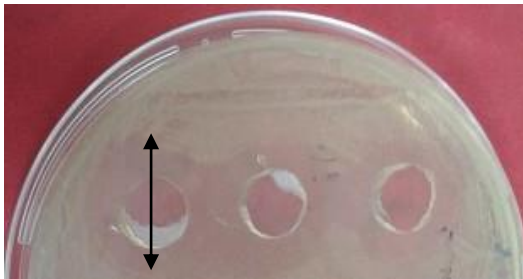
Şekil 4.33: M2-43 numaralı suşun *E. coli* ATCC 35218 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi.



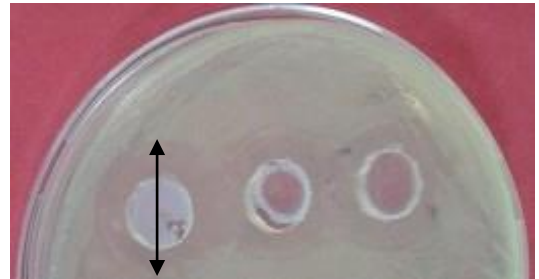
Şekil 4.34: M2-24 numaralı suşun *S. enteritidis* ATCC 13076 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi.



Şekil 4.35: M2-43 numaralı suşun *S. enteritidis* ATCC 13076 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi.

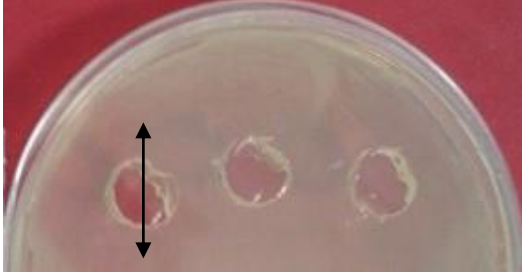


Şekil 4.36: M2-24 numaralı suşun *S. sonnei* Mu:57 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi.

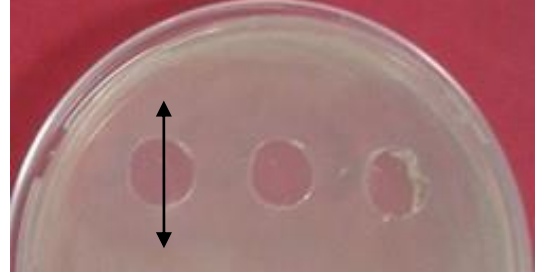


Şekil 4.37: M2-43 numaralı suşun *S. sonnei* Mu:57 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi.

İzolatların balık patojen mikroorganizmalara antimikrobiyal etkisi ile ilgili şekiller aşağıda verilmiştir (Şekil 4.38, Şekil 4.39).



Şekil 4.38: M2-24 numaralı suşun *A. hydrophila* üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi.



Şekil 4.39: M2-43 numaralı suşun *A. hydrophila* üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada anne sütünden izole edilen *Lactobacillus spp.* cinsi bakterilerin bazı starter ve probiyotik özellikleri belirlenmiştir. Çalışma genel anlamda üç aşamadan oluşmaktadır.

Öncelikle anne sütünden izole edilen basil morfolojisine sahip bakteriler API 50 CHL kitiyle tanımlanmış ve yüksek tanımlama oranına sahip üç bakteri suşu seçilmiştir. Bu suşlardan birinin *L. fermentum* (M2-6), diğer iki suşun da *L. acidophilus* (M2-24 ve M2-43) olduğu belirlenmiştir.

İkinci aşamada izolatların bazı starter özelliklerinin belirlenmesi üzerine testler yapılmıştır.

İzolatların 15 °C ve 45 °C sıcaklıklarda gelişimi incelendiğinde her üç suşun 45 °C de geliştiği, 15 °C de ise M2-24 ve M2-43 numaralı suşların zayıf geliştiği, M2-6 numaralı suşun gelişmediği belirlenmiştir.

% 2, % 4, % 5 ve % 6,5 oranında NaCl içeren besiyerlerinde optimum koşullarda yapılan inkübasyon sonucunda üç suş da % 2, % 4, % 5 oranında NaCl içeren ortamlarda gelişim göstermiş, ancak M2-24 numaralı suşun % 5 NaCl içeren ortamda zayıf geliştiği gözlenmiştir. % 5 gibi yüksek oranda tuz içeren ortamda bakteri suşlarının gelişim göstermesi, özellikle peynir gibi tuzlu gıdaların fermentasyonunda starter olarak kullanım potansiyelini arttırmaktadır.

İzolatların asit üretme yeteneklerini belirlemek üzerine yapılan testte 48 saat içerisinde yapılan pH ölçümlerine göre pH'nın zamanla azaldığı ve üç suşunda asit üretme yeteneğine sahip olduğu görülmüştür. Çoğu mikroorganizma düşük pH'ya toleranslı değildir. Bu yüzden izolatları tamamının asit üretme yeteneğine sahip olmaları hem starter hem de probiyotik olarak kullanım potansiyelini arttırmaktadır.

Tüm izolatların EPS üretimlerinin yapılan benzer çalışmalardaki LAB'nin EPS üretimlerine kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. En yüksek EPS üretimi 4,34 g/L ile M2-6 numaralı suşta gözlenmiştir. EPS'ler bakterileri hem olumsuz çevre koşullarına hem de antibiyotiklere karşı fiziksel anlamda koruduğundan izolatların starter olarak kullanım potansiyelini arttırmaktadırlar.

İzolatların nisine karşı dirençliliklerini belirlemek üzere yapılan testte M2-6 numaralı suşun tüm konsantrasyon değerlerinde nisine dirençlilik göstermesi önemli bir sonuçtur. Diğer iki suşun nisine dirençlilikleri karşılaştırıldığında M2-43 numaralı suşun M2-24 numaralı suşa kıyasla daha yüksek dirençliliğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Nisin önemli bir bakteriyosin olması nedeniyle gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadır. Anne sütünden izole edilen tüm suşların nisinin belirli konsantrasyonlarına karşı dirençlilik göstermesinin, izolatların starter olarak kullanım potansiyelini arttırdığı söylenebilir.

Üçüncü ve son aşamada izolatların bazı probiyotik özelliklerinin belirlenmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır.

İzolatların düşük pH'ya toleransının belirlenmesi amacıyla yapılan testte; izolatlar, pH'sı 3,9'a ayarlanmış besiyerlerinde optimum koşullarda inkübasyona bırakılmış, suşların 12 ve 24. saatlerde yapılan kontrolleri sonucunda üç suşun da düşük pH'da gelişim gösterdiği ancak M2-24 numaralı suşun zayıf geliştiği belirlenmiştir. Düşük pH değerlerinde suşların gelişim göstermesi mide pH'sına tolerans göstermeleri açısından önemli bir sonuçtur. Bu sonuç suşların probiyotik olarak kullanım potansiyelini arttırmaktadır.

Antibiyotik duyarlılık test sonuçları incelendiğinde, tüm suşların kanamycine dirençli olduğu, M2-24 ve M2-43 numaralı suşların gentamicine dirençli oldukları, ancak her üç suşun da ampicillin, erythromycin ve penicillin G türü antibiyotiklere karşı duyarlı oldukları tespit edilmiştir.

Normal mikrofloranın antibiyotik tedavilerinden etkilenmemesi için seçilecek suşların antibiyotiklere dirençli olması önemli bir kriter olmakla birlikte, bazı LAB'nin plazmitler tarafından kodlanan antibiyotik dirençlilik genleri taşıması ve antibiyotik dirençliliğinin patojen ya da patojen olmayan bakterilere transferinin son derece önemli olduğu belirtilmektedir. Plazmitlerle dirençlilik özelliği taşıyan bu suşların insan ve hayvanlarda probiyotik olarak kullanılmasının uygun olmadığı, transfer edilemeyen dirençliliğin uygulamalarda yararlı olabildiği bildirilmiştir. (Verraes vd., 2013; Ishiwa ve Iwata, 1980; Adams ve Marteau, 1995; Fons vd., 1997; Charteris vd., 1998; Salminen vd., 1998).

Probiyotiklerin antibiyotiklere karşı dirençli olmaları probiyotiklerde aranan özelliklerden birisidir. Bu yüzden tüm suşların kanamycine karşı dirençli olmaları, suşların probiyotik olarak kullanım potansiyelini arttırmaktadır. Bazı antibiyotik dirençlilik genleri, patojen ya da patojen olmayan mikroorganizmalara plazmitlerle taşınabileceğinden, tüm suşların; ampicillin, erythromycin ve penicillin G'ye duyarlı olmaları da suşların probiyotik kullanım potansiyeli açısından olumludur.

İzolatların insan patojen mikroorganizmalara antimikrobiyal etkisi incelendiğinde M2-6 numaralı suşun antimikrobiyal aktivite göstermediği, M2-24 ve M2-43 numaralı suşların ise test mikroorganizmaları üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. M2-24 ve M2-43 numaralı suşların türleri aynı olmasına rağmen M2-24 numaralı suş daha yüksek antimikrobiyal aktivite göstermiştir. İnsan patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivite gösteren suşlar, aynı zamanda insan orijinli olması nedeniyle insanlarda probiyotik olarak kullanım potansiyeli taşımaktadır.

İzolatların balık patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisini belirlemeye yönelik çalışmaların sınırlı sayıda olması bu testi daha önemli hale getirmiştir. Sonuçlar incelendiğinde üç suşunda *A. hydrophila* ATCC 19570'e karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği, bunun yanında M2-24 numaralı suşun *L. garvieae*, *Y. ruckeri* ve *V. anguillarum* M1'e karşı, M2-43 numaralı suşun ise *V. anguillarum* M1'e karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmamızda test edilen balık patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivite gösteren suşlar, antibiyotiklere alternatif olan probiyotik mikroorganizmalar olarak kullanım potansiyeli taşımaktadır.

Elde edilen tüm sonuçlar dikkate alındığında üç suşun da starter olarak kullanım potansiyelinin bulunduğu, M2-24 ve M2-43 numaralı suşların probiyotik olarak kullanım potansiyellerinin bulunduğu belirlenmiştir. M2-6 numaralı suş probiyotik özellikleri belirlemeye yönelik testlerden olumlu sonuçlar almasına rağmen test mikroorganizmaları üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. Ancak yapılacak çalışmalarda M2-6 numaralı suş kullandığımız test mikroorganizmaları dışında başka mikroorganizmalara antimikrobiyal aktivite gösterebilir. Bu durumda bu suşun da probiyotik olarak kullanım potansiyelinin de artacağı düşünülebilir.

KAYNAKLAR

- Adams, M.R. ve Marteau, P., 1995. On the safety of lactic acid bacteria from food, *International Journal of Food Microbiology*, 27, 263-264.
- Alfaleh, K., 2014. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterms infants, *Evidence-Based Child Health: A Cochrane Review Journal*, 9, 3, 584-671.
- Alpkent, Z., Kubat, U., 2002. Anne Sütünde Bulunan Biyoaktif Maddeler, *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 11, 41-45,
- Andrighetto, C., Dea, P.D., Lombardi, A., Neviani, E., Rossetti, L., Giraffa, G., 1998. Molecular identification and cluster analysis of homofermentative thermophilic lactobacilli isolated from dairy products, *Research in Microbiology*, 149, 631-643.
- Anonim, 2005. Türk Gıda Kodeksi Koyulaştırılmış Süt ve Süttozu Tebliği No: 2005/18.
- Arıcı, M., Coşkun, F., Mirik, M., Gülcü, M., 2011. Hardaliyeden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Tanımlanması, Teknolojik ve Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi, *Tekirdağ Üniversitesi*, (Proje No:TÜBİTAK 110O018).
- Banks, J.M., Williams, A.G., 2004. The Role of the Nonstarter Lactic Acid Bacteria in Cheddar Cheese Ripening, *International Journal of Dairy Technology*, 57, 2/3, 145-152.
- Bausserman, M., Michail, S., 2005. The use of *Lactobacillus* GG in irritable bowel syndrome in children: a double-blinded randomized control trial, *The Journal of Pediatrics*, 147, 197-201.
- Bekkali, NLH., Bongers, MEJ., Van den Berg, MM., Liem, O., Benninga, MA., 2007. The role of probiotics mixture in the treatment of childhood constipation, a pilot study, *Nutrition Journal*, 6, 17.
- Beyatlı, Y., Aslım, B., Yüksekdağ, Z.N., Önal Darılmaz, D., 2010. Türkiye'nin Geleneksel Peynirlerinde Bulunan Propiyonik Asit Bakteri Türlerinin Belirlenerek, Bazı Probiyotik ve Starter Özelliklerinin Araştırılması, *Ankara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi*, (TÜBİTAK Proje No: 107T486).

- Bhatt, V.D., Vaidya, Y.H., Kunjadia, P.D., Kunjadia, A.P., 2012. Isolation and Characterization of Probiotic Bacteria From Human Milk, International Journal of pharmaceutics science and health care. <http://www.rpublication.com/ijphc/index.html>, 03.02.2015.
- Brady, L.J., Gallaher, D.D., Busta, F.F., 2000. The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer, Journal of Nutrition, 130, 410–414.
- Caridi, A., 2003. Identification and First Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated From the Artisanal Ovine Cheese Pecorino del Poro, International Journal of Dairy Technology, 56, 2, 105-110.
- Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M.J., Landon, M., 1986. Isolation and characterization of exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus*, Biotechnology Letters, 8, 625- 628.
- Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M.J., Landon, M., 1988. Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*, Biotechnology Letters, 10, 255-260.
- Cerning, J. ve Bouillanne, C., 1992. Isolation and characterisation of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria, Journal of Dairy Science, 75, 692-699.
- Cerning, J., 1995. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria, Le Lait, 75, 463- 472.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. ve Collins, J.K., 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species, Journal of Food Protection, 61, 1636-1643.
- Chuayana, Jr. E.L., V. Ponce, C., Rivera, M.R.B., Cabrera, E.C., 2003. Antimicrobial activity of probiotics from milk products, The Philippine Journal of Microbiology and Infectious Diseases, 32, 2, 71- 74.
- Claridge, S., 2006. Mother's Milk: Precious Protection, Original Article, DOI: http://www.archetypeltd.co.nz/Mothers_milk.htm, 12.03.2015.
- Cogan, T.M. ve Hill, C., 1993. Cheese starter cultures, Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, 1, 2nd Edition (Ed.) Fox, P.F. Chapman-Hall, London, 193–255.
- Cogan, T.M., 1996. Dairy Starter Cultures, VCH Publishers, New York, 290.

- Corsetti, O., Lavermicocca, P., Morea, M., Baruzzi, F., Tosti, N. ve Gobbetti, M., 2001. Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of Southern Italy, *International Journal of Food Microbiology*, 64, 95–104.
- Çakır, İ., 2003. Laktobasillus ve Bifidobakterlerde Bazı Probiyotik Özelliklerin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Dağdemir, E., 2006. Salamura beyaz peynirlerden izole edilen laktik asit bakterilerin tanımlanması ve seçilen bazı izolatların kültür olarak kullanılma imkanları, Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Daly, C., Fitzgerald, G.F., O'Connor, L., Davis, R., 1998. Technological and health benefits of dairy starter cultures, *International Dairy Journal*, 8, 195-205.
- Danova, S., Petrov, K., Pavlov, P. ve Petrova, P., 2005. Isolation and characterization of *Lactobacillus* strains involved in koumiss fermentation, *International Journal of Dairy Technology*, 58, 2, 100-106.
- Darılmaz, D., Aslım, B., Suludere, Z., Akça, G., 2011. Influence of gastrointestinal system conditions on adhesion of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains to caco-2 cells, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54, 917- 926.
- De Vuyst, L., 2000. Technology aspects related to the application of functional starter cultures, *Food Technology and Biotechnology*, 38/2, 105-112.
- Delcour, J., Ferain, T., Hols, P., 2000. Advances in the genetics of thermophilic lactic acid bacteria, *Current Opinion in Biotechnology*, 11, 497-504.
- Deutsch, S.M., Neveu, A., Guezenec, S., Ritzenthaler, P., Lortal, S., 2003. Early lysis of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 303 in Swiss Cheese is not Prophage-related, *International Journal of Food Microbiology*, 8, 147-157.
- Dickson, E.M., Riggio M.P., Macpherson, L., 2005. A novel species-specific PCR assay for identifying *Lactobacillus fermentum*, *Journal of Medical Microbiology*, 54, 299-303.
- Duboc, P., ve Mollet, B., 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry, *International Dairy Journal*, 11, 759-768.

- Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., Quigley, E.M.M., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F. ve Collins, J.K., 1999. Probiotics: From myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials, *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 279-292.
- Dunne, C., 2001. Adaptation of bacteria to the intestinal niche: probiotics and gut disorder, *Inflammatory Bowel Diseases*, 7, 136-145.
- Dunne, C., 2002. The survival and colonic adhesion of *Bifidobacterium infantis* in patient with ulcerative colitis, *International Dairy Journal*, 12, 197-200.
- Escalante, A., Wachter-Rodarte, C., Garcia- Garlybay, M., Farres, A., 1998. Enzymes involved in carbohydrate metabolism and their role on exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*, *Journal of Applied Microbiology*, 84, 108- 114.
- Ewaschuk, J. B. and Dieleman, L. A., 2006. Probiotics and prebiotics in choronic inflammatory bowel diseases, *World Journal of Gastroenterology*, 12, 5941-5950.
- Faber, E.J., Kameling, J.P. ve Vliegenthart J.P., 2001. Structure of extracellular polysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 291, *Carbonhydrate Research*, 331, 183-194.
- Facklam, R., Sahm, R.D.S., Teixeira, L.M., 2002. Standart Laboratory Methods for Identfiying and Growing Enterococci, *Manual of Clinical Microbiology*, ASM Press.
- Fernandez, M.F., Boris, S., Barbés, C., 2003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract., *Journal of Applied Microbiology*, 94, 449-455.
- Fernandez, L., Langa, S., Martin, V., Maldonado, A., Jimenez, E., Martin, R., Rodriguez, JM., 2013. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease, *Pharmacological Research*, 69, 1-10
- Foulquie-Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., 2006. The role and application of enterococci in food and health, *International Journal of Food Microbiology*., 106, 1-24.
- Fons, M., Hege, T., Ladire, M., Ralbaud, R., Duoluzeau, R. ve Maguin, E., 1997. Isolation and characterization of plasmid from *Lactobacillus fermentum* conferring erythromycin resistance, *Plasmid*, 37, 3, 199-203.

- Fukushima, Y., Kawata, Y., Hara, H., Terada, A., Mitsuoka, T., 1998. Effect of probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children, *International Journal of Food Microbiology*, 42, 39–44.
- Gerasi, E., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N., 2003. Microbiological study of Manura, a Hard Cheese Made From Raw Ovine Milk in the Grek Island Sifnos, *International Journal of Dairy Technology*, 56, 2, 117-122.
- Gionchetti, P., Rizello, F., Venturi, A., Campieri, M., 2000. Probiotics in infective diarrhoea and inflammatory bowel disease, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 15, 489-493.
- Giraffa, G., Andrighetto, C., Antonella, C., Gatti, M., Lazzi, C., Marcazzan, G., Lombardi, A., Neviani, E., 2004. Genotypic and Phenotypic Diversity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* Strains of Dairy origin, *International Journal of Food Microbiology*, 91, 129-139.
- Gismondo, M.R., Drago, L., 1999. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *International Journal of Antimicrobiol Agents*, 12, 287-292.
- Gmeiner, M., Kneifel, W., Kulbe, K.D., Wouters, R., De Boever, P., Nollet, L., Verstraete, W., 2000. Influence of a synbiotic mixture consisting of *Lactobacillus acidophilus* 74-2 and a fructooligosaccharide preparation on the microbial ecology sustained in a simulation of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME reactor), *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 219–223.
- Goldin, B.R., Gorbach, S.L., 1984. The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 39, 756–761.
- Goldin, B., Gorbach, S.L., Saxelin, M., Barakat, S., Gualtieri, L., Salminen, S., 1992. Survival of *Lactobacillus* Species in Human Gastrointestinal Tract, *Digestive Diseases and Science*, 37, 121–128.
- Goldman, CG., Barrado, DA., Balcarce, N., vdl., 2006. Effect of a probiotic food as an adjuvant to triple therapy for eradication of *Helicobacter pylori* infection in children, *Nutrition*, 22, 984-8.
- Gomes, A.M.P. ve Malcata, F.X., 1999. *Bifidobacterium* ssp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics, *Trends in Food Science and Technology*, 10, 139–157.

- Guarner, F. ve Schaafsma, G.J., 1998. Probiotics, International Journal of Food Microbiology, 39, 237-238.
- Guarner, F., Perdigon, G., Corthier, G., Salminen, S., Koletzko, B. ve Morelli, L., 2005. Should yoghurt cultures be considered probiotic, British Journal of Nutrition, 93:783-786.
- Gürsoy, O., Kayardı, S., 1999. Diyet acidophilus bifidus yoğurdu ve diyet yoğurdun kalite niteliklerinin incelenmesi, Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 5, 1109–1114.
- Halami, P.M., Chandrashekar, A., Nand, K., 2000. *Lactobacillus farciminis* MD, a New Strain with Potential for Bacteriocin and Antibiotic Assay, Letters in Applied Microbiology, 30, 197-202
- Hansen, J.N., 1994. Nisin as a model food preservative, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 34 (1), 69-93.
- Hansen, B.V., Houlberg, U., Ardö, Y., 2001. Transamination of Branched-chain Amino Acids by a Cheese Related *Lactobacillus paracasei* strain, International Dairy Journal, 11, 225-233.
- Hanson, L., Koroithova, M., 2002. The Role of Breastfeeding in Prevention of Neonatal Infection, Semin Neonatol, 7, 275-281.
- Heikkilä, M.P., Saris, P.E.J., 2003. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk, Journal of Applied Microbiology, 95, 471–478.
- Heyman, M., 2002. Effect of Lactic Acid Bacteria on Diarrheal Diseases, National Institute of Health and Medical Research, INSERM E9925, Faculté Necker, 156 rue de Vaugirard, 75730 Paris, France.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H., Staley, J.T., Williams, S.T., 2000. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 527-567.
- Holzappel, W.H., 1997. Use of starter cultures in fermentation on a household scale, Food Control, 8, 241-258.
- Holzappel, W.H., Schillinger, U., 2002. Introduction to pre- and probiotics, Food Research International, 35, 109–116.
- Holzappel, W.H., 2003. *Enterococci* in foods, Functional and safety aspects, International Journal of Food Microbiology, 88, 103–346.

- Hugenholtz, J., Looijesteijn, E., Starrenburg, M. ve Dijkema, C., 2000. Analysis of sugar metabolism in an EPS producing *Lactococcus lactis* by 31P NMR, Journal of Biotechnology, 77, 17- 3.
- Hynes, E.R., Bergamini, C.V., Suarez, V.B., Zalazar, C.A., 2003. Proteolysis on Reggianito Argentino Cheeses Manufactured With Natural Whey Cultures and Selected Strains of *Lactobacillus helveticus*, Journal of Dairy Science, 86, 3831-3840.
- Ishiwa, H., ve Iwata, S., 1980. Drug resistance plasmids in *Lactobacillus fermentum*, The Journal of General and Applied Microbiology, 26, 71-74.
- İşleroğlu, H., Yıldırım, Z., Yıldırım, M., 2008. Yöresel Peynirden Antimikrobiyal Aktiviteye Sahip Laktik Asit Bakterisinin İzolasyonu ve Tanısı, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 25, 1, 1-6.
- Jolly, L. ve Stingle, F., 2001. Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene clusters in lactic acid bacteria, International Dairy Journal, 11, 733-745.
- Kandler, O., Weiss, N., 1986. Genus *Lactobacillus* Beijerinck. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ed. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M. E. And Holt, J.G. Vol.2, pp.1209-1234. Baltimore, MD: Williams and Wilkins.
- Kanmani, P., Satish Kumar, R., Yuvaraj, N., Paari, K.A., Pattukumar, V., Arul, V., 2013. Probiotics and its functionally valuable products, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 53, 641-658.
- Karahan, A. G. ve Çakmakçı, M. L., 1996. Probiyotikler. Gıda Dergisi, 21, 4, 297-302.
- Kılıç, S., 2001. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 542, 451 s, İzmir.
- Kışla, D., Ünlütürk, A., 1998. A new type of fermented milk product manufactured by *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum*, Advances in Food Sciences, 20, 234-39.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G., 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria, International Journal of Food Microbiology, 41, 103-25.
- Lewus, C.B., Kaiser, A., Montville, J.T., 1991. Inhibition of Food-Borne Bacterial Pathogens by Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat, Applied and Environmental Microbiology, 57 (6), 1683-1688.

- Lhys, U., 2002. Lactic acid bacteria associated with spoilage of fish products, Akademik Tez, University of Helsinki, Finland.
- Lynch, C. M., McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cogan, T.M., Drinana, F.D., 1996. Manufacture of Cheddar Cheese With and Without Adjunct Lactobacilli Under Controlled Microbiological Conditions, *International Dairy Journal*, 6, 851-867.
- Madiedo, P.R. ve Reyes-Gavilan, C.G., 2005. Invited review: methods for the sceeding, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, *Journal of Dairy Science*, 88, 843-856.
- Marshall, V.M., Dunn, H., Elvin, M., M Lay, N., Gu, Y. ve Laws, A.P., 2001. Structural characterisation of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* EU20, *Carbohydrate Research*, 331, 413- 422.
- Martin, R., Langa, S., Reviriego, C., Jimenez, E., Marin, ML., Xaus, J., Fernandez, L. ve Rodriguez, JM., 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut, *The Journal of Pediatrics*, 143, 754–758.
- Martin, R., Langa, S., Reviriego, C., Jimenez, E., Marin, L.M., Olivares, M., Boza, J., Fernandez, L., Xaus, J., Rodriguez, M., 2004. The Commensal Microflora of Human Milk: New Perspectives for Food Bacteriotherapy and Probiotics, *Trends in Food Science and technology*, 15, 121-127.
- Martin, R., Olivares, M., Marin, M.L., Fernandez, L., Xaus,J., Rodriguez, J.M., 2005. Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk, *Journal of Human Lactation*, 21, 8–17.
- Martin, R., Jimenez, E., Olivares, M., Marin, M.L., Fernandez, L., Xaus, J., Rodriguez, J.M., 2006. *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother – child pair, *International Journal of Food Microbiology*, 112, 35–43.
- Matsumiya, Y., Kato, N., Watanabe, K., 2002. Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal *Lactobacillus* species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction, *Japanese Society of Chemotherapy and The Japanese Association for Infectious Diseases*, 8,43-49.
- Mayra-Makinen, A., Birget, M., 1998. Industrial use and production of lactic acid bacteria. In: *Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Functional Aspects* (Eds.) Salmien, S., von Wirgth, A. Marcel Dekker, Inc., New York, 73-103.

- McCartney, A. L., Wenzhi, W., Tannock, G.F., 1996. Molecular Analysis of the Bifidobacterial and *Lactobacillus* Microflora of Human, Applied and Environmental Microbiology, 4608-4613.
- Mehrnia, L., Yüksekdağ, ZN., Aslım, B., 2014. Anne sütü ile beslenen bebeklerin dışkılarından izole edilen *Lactobacillus* türlerinin bazı probiyotik özelliklerinin araştırılması, Elektronik Mikrobiyoloji, 12, 1, 67-81.
- Miele, E., Pascarella, F., Giannetti, E., Quaglietta, L., Baldassano, RN., Staiano, A., 2009. Effect of a probiotic preparation (VSL#3) on induction and maintenance of remission in children with ulcerative colitis, The American Journal of Gastroenterology, 104, 437-443.
- Musumeci, M., Simpo, J., D'Agata, A., Sotgiu, S., Musumeci, S., 2006 Oligosaccharides in Colostrum of Italian and Burkinabe Women, Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 43, 372-378.
- Nakajima, H., Suzuki, Y., Kauzu, H., ve Hirota, T., 1992. Cholesterol-lowering activity of ropy fermented milk, Journal of Food Science, 57, 1327-1329.
- Nagaoka, M., Hashimoto, S., Watanabe, T., Yokokura, T. ve Mari, Y., 1994. Antiulcer effects of lactic acid bacteria and their cell-wall polysaccharides, Biological & Pharmaceutical Bulletin, 17, 1012-1017.
- Niedzielin, K., Kordecki, H., Birkenfeld B., 2001. A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299V in patients with irritable bowel syndrome, European Journal of Gastroenterology & Hepatology, 13, 1143-1147.
- Okereke, A. ve Montville, T.J., 1991. Bacteriocin inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria, Journal of Food Protection, 54, 349-353.
- Olson, N.F., 1990. The impact of lactic acid bacteria on cheese Flavour, Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews, 87, 131-138.
- Orla-Jensen, S., 1919. The lactic acid bacteria, A. F. Host & Sons Forlag, Copenhagen, 1-196.
- Özgün, D., 2009. Anne sütü (kolostrum) ve bebek feçeslerinden *Lactobacillus* cinsi bakteri suşlarının izolasyonu ve API 50 CHL sistemi ile identifikasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Palles, T., Beresford, T., Condon, S., Cogan, T.M., 1998. Citrate Metabolism in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*, Journal of Applied Microbiology, 85, 147-154.

- Rastall, R., Gibson, G.R., Gill, H.S., Guarner, F., Klaenhammer, T.R., Pot, B., Reid, G., Rowland, I.R. ve Sanders, M.E., 2005. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications, *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, 52, 145-152.
- Reinheimer, J.A., Demkow, M.R., Condioti, M.C., 1990. Inhibition of Coliform bacteria by lactic cultures, *The Australian Journal of Dairy Technology*, May, 5-9.
- Reid, G., 2002. The potential role of probiotics in pediatric urology, *The Journal of Urology*, 168, 1512-1517.
- Rollins, M., Joseph, S.W., 2000. BSCI 424 - Pathogenic Microbiology, Antibiotic Disk Susceptibilities (Kirby-Bauer Disk-Diffusion Method), <http://www.life.umd.edu/classroom/bsci424/LabMaterialsMethods/AntibioticDisk.htm>, 10.03.2015.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Mättö, J., Mattila-Sandholm, T., 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties, *Journal of Biotechnology*, 84, 197-215.
- Sağdıç, O., Arıcı, M., Şimşek, O., 2002. Selection of Starters for Traditional Turkish Yayık Butter Made from Yoghurt, *Food Microbiology*, 19, 303-312.
- Salminen, S., Wright von, A., 1993. *Lactic Acid Bacteria*, 270 Madison Avenue, New York 1001, USA.
- Salminen, S., Von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Buassant, D., Vos de, W.M., Fonden, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E. ve Sandholm, T.M., 1998. Demonstration of safety of probiotics-a review, *International Journal of Food Microbiology*, 44, 93-106.
- Sanders, M. E., 1999. Probiotics. *Food Technology*, 53, 67-77.
- Sanders, M.E. ve Huis in't Veld J., 1999. Bringing a probiotic- containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues, *Antonie van Leeuwenhoek*. 76, 293-315.
- Schleifer, K.H., 1987. Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria, *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, 46, 201-203.

- Sentongo, T.A., Cohran V, Korff S, Sullivan C, Lyer K, Sheng X., 2008. Intestinal permeability and effects of *Lactobacillus rhamnosis* therapy in children with short bowel syndrome, *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*, 46, 41-47.
- Shinoda, T., Kusuda, D., Ishida, Y., Ikeda, N., Kaneko, K., Masuda, O., 2001. Survival of *Lactobacillus helveticus* strain CP53 in the human gastrointestinal tract, *Letters in Applied Microbiology*, 32, 108-113.
- Shortt, C., 1999. The probiotic century: historical and current perspectives, *Trends in Food Science & Technology*, 10, 411–417.
- Smitinont, T., Tansakul, C., Tanasupawat, S., Keeratipibul, S., Navarini, L., Bosco, M., Cescutti, P., 1999. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization, *International Journal of Food Microbiology*, 51, 105-111
- Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Hold, J. G., 1986. *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology*, 2, 1208-1234.
- Sönmez, N., Çakmakçı, M.L., Karahan, A.G., 1999. Probiyotik kullanımı ve ülke şartlarında geliştirilmesi, *Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu Müdürlüğü, Araştırma Projesi* (yayınlanmamış), Ankara.
- Stiles, M.E. ve Holzapfel W.H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxomony, *International Journal of Food Microbiolgy*, 36, 1-29.
- Szajewska, H., Mrukowics, JZ., 2005. Use of probiotics in children with acute diarrhea, *Paediatric Drugs*, 7, 111-112.
- Tannock, G.W., 1997. Probiotic properties of lactic acid bacteria: plenty of scope for fundamental R&D, *Trends in Biotechnology*, Vol 15, 270-274.
- Tannock, G.W., 1999. Identification of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*, *Current Issues Molecular Biology*, 1, 53–64.
- Tannock, G.W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., vd., 1999. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23SrRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons, *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4264-4267.
- Tannock, G.W., Munro, K., Harsmen, H. J., Welling, G. W., Smat, J., Gopal, P. K., 2000. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2578-2588.

- Tekinşen, OC., Atasever, M., 1994. Süt Ürünleri Üretiminde Starter Kültür, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi, Konya.
- Teuber, M., 1995. The genus *Lactococcus*, in the lactic acid bacteria, the genera of lactic acid bacteria, Blackie Academics and Professionals, 2, 173-235.
- Toksoy, A., 1996. *Lactobacillus plantarum* ve *Pediococcus pentosaceus* Suşlarının Metabolik ve Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Tsai, H. J. ve Sandine, W. E. 1987. Conjugal transfer of nisin plasmid genes from *Streptococcus lactis* 7962 to *Leuconostoc dextranicum* 18 1, Applied and Environmental Microbiology, 53, 352-357.
- Tunail, N. ve Köşker, Ö., 1986. Süt Mikrobiyolojisi, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 966, Ankara.
- Turantaş, F., 1999. Fermantasyonda Rol Oynayan Mikroorganizmalar. İçinde Gıda Mikrobiyolojisi (Ünlütürk, A., Turantaş, F. ed.), İkinci Baskı, İzmir. 425-473.
- Vanderhoof, JA., Young, RJ., 1998. Use of probiotics in childhood gastrointestinal disorders, Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition, 27, 323-332.
- Vanderhoof, J., Whitney, D., Antonson, DL., Hanner, TL., Lupo, JP., Young, RJ., 1999. *Lactobacillus* GG In the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children, The Journal of Pediatrics, 8, 135-564
- Verraes, C., Van Boxtael, S., Van Meervenne, E., Van Coillie, E., Butaye, P., Catry, B., de Schaetzen, M.A., Van Huffel, X., Imberechts, H., Dierick, K., Daube, G., Saegerman, C., De Block, J., Dewulf, J., Herman, L., 2013. Antimicrobial resistance in the food chain, International Journal of Environmental Research and Public Health, 10, 2643-2669.
- Vinderola, C. G., Bailo, N., Reinheimer, J. A., 2000. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage, Food Research International, 33, 97-102.
- Vogelmann, S.A., Seitter, M., Singer, U., Brandt, M., Hertel, C., 2009. Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava and use of competitive strains as starters, International Journal of Food Microbiology, 130, 205-212.
- Wallace, B., 2009. Clinical use of probiotics in the pediatric population, Nutrition in Clinical Practice, 9, 24-50.

- Weaver, LT., 2003. Prentice A. Nutrition in infancy, In: Morgan JB, Dickerson WT, editors, Nutrition in Early Life. London: Wiley, 20-32.
- Weinrichter, B., Sollberger, H., Ginzinger, W., Jaros, D., Rohm, H., 2004. Adjunct Starter Properties Affect Characteristic Features of Swiss-type Cheese, *Nahrung*, 48 (1), 73-79.
- Willem, M. de Vos., 1999. Gene expression systems for lactic acid bacteria, *Current Opinion Microbiology*, 2, 289-295.
- Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz J. and Smit, G., 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products, *International Dairy Journal*, 12, 91-109.
- Wright, A. T., Vilpponen-Salmela M. P. L., Collins K., Kiely B., Shanahan F., Dunne, C., 2002. The survival and colonic adhesion of *Bifidobacterium infantis* in patient with ulcerative colitis, *International Dairy Journal*, 12, 197-200.
- Yao, TC., Chang, CJ., Hsu, YH., Huang, JL., 2010. Probiotics for allergic diseases: realities and myths, *Pediatr Allergy and Immunology*, 21, 900-19.
- Yavuzdurmaz, H., 2007. Isolation, characterization, determination of probiotic properties of lactic acid bacteria from human milk, Yüksek Lisans Tezi, İzmir Yüksek teknoloji Enstitüsü, İzmir.
- Yaygın, H., Kılıç, S., 1993. Süt Endüstrisinde Saf Kültür, Altındağ Matbaası, İzmir.
- Yeniçel, N., 2006. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* suşlarının melas, peynir altı suyu ve pancar suyunda ekzopolisakkarit (EPS) ve laktik asit üretimlerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Yetişmeyen, A., 1995. Süt Teknolojisi, Ankara Üniversitesi Ziraat Fak., Yayın No:1420, Ankara, 229 sayfa.
- Yıldırım, Z., Yıldırım, M., 2000. Probiyotik özellik gösteren bifidobakteriler. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu (Ed. M. Demirci), Tekirdağ, 266-271.
- Yılmaztekin, M., 2001. Beyaz peynir üretiminde *Lactobacillus acidophilus* *Bifidobacterium bifidum*'dan yararlanma olanakları üzerine bir araştırma, Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa.
- Yılsay, T.Ö., Kurdal, E., 2000. Probiyotik süt ürünlerinin beslenme ve sağlık üzerindeki etkisi. VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu (Ed. M. Demirci), Tekirdağ, 279-286.

Yiğit, T., 2009. Süt ve Süt Ürünlerinden Probiyotik Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Hasan ÖZER
Doğum Tarihi ve Yeri: 10.03.1981-NEVŞEHİR
E-posta adresi : hasanozer_81@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : İnönü Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Öğretmenliği,
2002-2006

Yüksek Lisans : 2013-

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

Ağustos 2007'den beri MEB'de Fen Bilimleri Öğretmenliği.