



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

BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

**ANNE SÜTÜNDEN İZOLE EDİLEN *Streptococcus thermophilus*
SUŞLARININ BAZI BİYOTEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşe YAVUZ

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

AKSARAY, 2019

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 162330404 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi **Ayşe YAVUZ** tarafından hazırlanan “**ANNE SÜTÜNDEN İZOLE EDİLEN *Streptococcus thermophilus* SUŞLARININ BAZI BİYOTEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Meltem AŞAN ÖZÜSAĞLAM

Aksaray Üniversitesi

.....

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

Üye: Prof. Dr. Fatih ALGI

Aksaray Üniversitesi

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

.....

Üye: Prof. Dr. Songül Budak DİLER

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

.....

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

Tez Savunma Tarihi: 07/05/2019

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

.....

Doç. Dr. Mehmet Ali HINIS

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu, çalışmamda kullandığım verilerin orijinallliğini ve her türlü intihalden uzak olduğunu beyan ederim.

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.

Ayşe YAVUZ

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, tecrübe ve bilgilerinden yararlandığım, değerli görüşleri ile beni yüreklendiren bilimsel anlamda gelişebilmem için her türlü desteği veren hocam Sayın Doç. Dr. Meltem AŞAN ÖZÜSAĞLAM'a göstermiş olduğu üstün sabrı ve her türlü desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında bana destek olan ASÜ Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Bölümü lisans ve yüksek lisans öğrenci arkadaşlarıma ve üzerimde emeği geçen herkese candan teşekkür ederim.

Bugüne kadar bana göstermiş oldukları üstün sabır ve destekten ötürü kıymetli annem, babam ve kardeşlerime çok teşekkür ederim. Babam Ahmet YAVUZ'un hayali olan diplomayı benim alabilmem için gösterdiği çaba, fedakârlık ve desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışmam sırasında yardımlarını, dostluğunu ve desteğini esirgemeyen arkadaşım Burak DEMİR'e ve bu süre zarfında her zaman yanımda olan, beni yüreklendiren, desteklerini maddi manevi esirgemeyen sevgili arkadaşım İbrahim Zekeriya URASOĞLU'na teşekkürü borç bilirim.

Ayşe YAVUZ

AKSARAY, 2019

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1.GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 Laktik Asit Bakterileri.....	4
2.2 Streptococcus Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri	5
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	7
3.1 <i>S.thermophilus</i> MAS Suşlarının Genetik Olarak Tanımlanması	7
3.2 Güvenilirlik Testleri	7
3.2.1 Antibiyogram	7
3.2.2 Hemolitik aktivite	8
3.2.3 Jelatinaz aktivitesi	8
3.3 <i>S.thermophilus</i> MAS Suşlarının Bazı Biyoteknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	9
3.3.1 <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının düşük pH toleranslarının belirlenmesi	9
3.3.2 <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının safra toleranslarının belirlenmesi.....	9
3.3.3 <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi	10
3.3.4 <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının agregasyon özelliklerinin belirlenmesi ..	11
3.3.5 <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının hidrofobisite özelliklerinin belirlenmesi	13
3.3.6 <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının nisin dirençliliğinin belirlenmesi	14
3.3.7 <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının antioksidan aktivitenin belirlenmesi	14
3.3.8 <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının sodyum benzoat direnç özelliklerinin belirlenmesi	16
3.3.9 <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının enzim aktivitelerinin belirlenmesi	17
3.3.9.1 <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının amilaz enzim aktivitesinin belirlenmesi	17
3.3.9.2 <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının likenaz enzim aktivitesinin belirlenmesi	17
3.3.9.3 <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının proteaz enzim aktivitesinin belirlenmesi	18
3.3.9.4 <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının selüloz enzim aktivitesinin belirlenmesi	18
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	19
4.1 <i>S.thermophilus</i> MAS Suşlarının Genetik Olarak Tanımlanması	19
4.2 Antibiyogram	19
4.3 Hemolitik Aktivite	22
4.4 Jelatinaz Enzim Aktivitesi.....	24
4.5 Asit Safra Toleransı	25
4.6. Antimikrobiyal Aktivite	28
4.7 Agregasyon Özellikleri	31
4.8 Hidrofobisite	37

4.9 Nisin Dirençliliği.....	38
4.10 Antioksidan Aktivite	40
4.11 Sodyum Benzoat Dirençliliği	41
4.12 Amilaz, Likenaz, Proteaz, Selüloz Enzim Aktiviteleri	44
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	48
KAYNAKLAR	52
EKLER.....	57
EK .A. <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının PCR ile moleküler olarak identifikasyonu .	58
EK.B. <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının antibiyotik hassasiyeti inhibisyon zon değerleri.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	64



YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANNE SÜTÜNDEN İZOLE EDİLEN *Streptococcus thermophilus* SUŞLARININ BAZI BİYOTEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayşe YAVUZ

Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Meltem AŞAN ÖZÜSAĞLAM

ÖZET

Bu çalışma daha önce yürütülen bir proje dahilinde farklı gönüllü annelerden alınan sütlerden izole edilen beş adet *Streptococcus thermophilus* suşunun PCR tabanlı genetik identifikasyonu yapılmıştır. *S.thermophilus* MAS suşlarının güvenilirlik testleri kapsamında antibiyogram, hemolitik aktivite ve jelatinaz aktiviteleri test edilmiştir. *S.thermophilus* MAS suşlarının bazı biyoteknolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla asit ve safraya direnç, antimikrobiyal aktivite, agregasyon özellikleri, nisin dirençliliği, antioksidan aktivite, sodyum benzoat direnci, amilaz, likenaz, proteaz ve selüloz enzim aktivitelerinin yanı sıra hidrofobisite özellikleri incelenmiştir. MAS suşlarının hepsinin amilaz negatif, likenaz pozitif, proteaz negatif olduğu ve MAS-3 suşunun ise selüloz negatif, MAS-1, MAS-2, MAS-4 ile MAS-5 suşlarının selüloz pozitif olduğu belirlenmiştir. Test edilen on altı adet gıda-insan patojenine karşı MAS suşlarının hiçbirinin antimikrobiyal aktivite göstermediği tespit edilmiştir. MAS-2 ve MAS-3 suşları balık patojenlerinden *V.anguillarum* M1 ve *V.anguillarum* A4 patojenlerine karşı en düşük 1.88mm, en yüksek 3.34mm değerleri kaydedilmiştir. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi kapsamında, *S.thermophilus* MAS suşlarının DPPH radikalini indirgeme aktiviteleri %29.84-36.90 değerleri, *S.thermophilus* MAS suşlarının demir iyonu şelatlama aktiviteleri ise %23.44-30.13 değer aralığında kaydedilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Anne sütü, *Streptococcus thermophilus*, Antimikrobiyal, Agregasyon, Antioksidan aktivite

Mayıs, 2019; 66 sayfa

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION OF SOME BIOTECHNOLOGICAL PROPERTIES OF *Streptococcus thermophilus* STRAINS ISOLATED FROM HUMAN MILK

Ayşe YAVUZ

Aksaray University
Institute of Science and Technology
Department of Biotechnology and Molecular Biology

Supervisor: Doç. Dr. Meltem AŞAN ÖZÜSAĞLAM

ABSTRACT

In this study, PCR based genetic identification of five *Streptococcus thermophilus* strains isolated from milk taken from different volunteer mothers was performed. The antibiogram, hemolytic activity and gelatinase activities of the strains of *S.thermophilus* MAS were tested. In order to determine some biotechnological properties of *S.thermophilus* MAS strains, resistance to acid and bile, antimicrobial activity, aggregation properties, nisin resistance, antioxidant activity, sodium benzoate resistance, amylase, lichenase, protease and cellulase enzyme activities as well as hydrophobicity properties were investigated. All of the MAS strains were found to be amylase negative, lichenase positive, protease negative and MAS-3 strains were cellulase negative, MAS-1, MAS-2, MAS-4 and MAS-5 strains were positive for cellulase. None of the MAS strains showed antimicrobial activity against sixteen tested human to human pathogens. MAS-2 and MAS-3 strains inhibited fish pathogens *V.anguillarum* M1 and *V.anguillarum* A4 pathogens with inhibition zone varied from 1.88mm to 3.34mm. In the determination of antioxidant activity, DPPH radical reduction activities of *S.thermophilus* MAS strains were recorded as 29.84-36.90% and iron ion chelating activities of *S.thermophilus* MAS strains were recorded as 23.44-30.13%.

Keywords: Human milk, *S.thermophilus*, Antimicrobial, Aggregation, Antioxidant activity

May, 2019; 66 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. <i>S.thermophilus</i> MAS-1 suşu amikasin antibiyotik hassasiyeti	21
Şekil 4.2. <i>S.thermophilus</i> MAS-2 suşu polimiksin b antibiyotik hassasiyeti.	21
Şekil 4.3. <i>S.thermophilus</i> MAS-1 suşu nalidiksik asit antibiyotik hassasiyeti.	21
Şekil 4.4. <i>S.thermophilus</i> MAS-1 suşu kloksasilin antibiyotik hassasiyeti.	22
Şekil 4.5. <i>S.thermophilus</i> MAS-1 hemolitik aktivite sonuçları (alfa hemolitik).	23
Şekil 4.6. <i>S.thermophilus</i> MAS-2 hemolitik aktivite sonuçları (gama hemolitik). ...	23
Şekil 4.7. <i>S.thermophilus</i> MAS-3 hemolitik aktivite sonuçları (alfa hemolitik).	23
Şekil 4.8. <i>S.thermophilus</i> MAS-4 hemolitik aktivite sonuçları (gama hemolitik)	24
Şekil 4.9. <i>S.thermophilus</i> MAS-5 hemolitik aktivite sonuçları (gama hemolitik). ...	24
Şekil 4.10. <i>S.thermophilus</i> MAS-2 suşu jelatinaz aktivitesi.	25
Şekil 4.11. <i>S.thermophilus</i> MAS-5 suşu jelatinaz aktivitesi.	25
Şekil 4.12. a) <i>S.thermophilus</i> MAS-1 <i>V.anguillarum</i> A4 b) <i>S.thermophilus</i> MAS-2 <i>V.anguillarum</i> A4 antifungal aktivitesi.	30
Şekil 4.13. a) <i>S.thermophilus</i> MAS-1 <i>C.albicans</i> ATCC 10231 b) <i>S.thermophilus</i> MAS-2 <i>C.albicans</i> ATCC 10231	31
Şekil 4.14. <i>S.thermophilus</i> MAS-1 otoagregasyon mikroskop görüntüsü.	32
Şekil 4.15. <i>S.thermophilus</i> MAS-2 otoagregasyon mikroskop görüntüsü.	32
Şekil 4.16. <i>S.thermophilus</i> MAS-3 otoagregasyon mikroskop görüntüsü.	32
Şekil 4.17. <i>S.thermophilus</i> MAS-3 <i>L.garvieae</i> koagregasyon mikroskop görüntüsü.	34
Şekil 4.18. <i>S.thermophilus</i> MAS-3 <i>V.anguillarum</i> A4 koagregasyon mikroskop görüntüsü.	34
Şekil 4.19. <i>S.thermophilus</i> MAS-2 <i>V.anguillarum</i> A4 koagregasyon mikroskop görüntüsü.	34
Şekil 4.20. <i>S.thermophilus</i> MAS-5 <i>Y.ruckeri</i> koagregasyon mikroskop görüntüsü. .	35
Şekil 4.21. <i>S.thermophilus</i> MAS-4 <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853 koagregasyon mikroskop görüntüsü.	36
Şekil 4.22. <i>S.thermophilus</i> MAS-5 <i>Shigella sonnei</i> MU:57 koagregasyon mikroskop görüntüsü.	36
Şekil 4.23. <i>S.thermophilus</i> MAS-3 <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853 koagregasyon mikroskop görüntüsü.	37
Şekil 4.24. <i>S.thermophilus</i> MAS- 2 <i>Y.enterolitica</i> ATCC 11175 koagregasyon mikroskop görüntüsü.	37
Şekil 4.25. <i>S.thermophilus</i> MAS-1 hidrofobisite görüntüsü.	38
Şekil 4.26. <i>S.thermophilus</i> MAS-5 hidrofobisite görüntüsü.	38
Şekil 4.27. <i>S. thermophilus</i> MAS-1 nisin dirençliliği	39
Şekil 4.28. <i>S. thermophilus</i> MAS-2 nisin dirençliliği	39
Şekil 4.29. <i>S. thermophilus</i> MAS-5 nisin dirençliliği	40
Şekil 4.30. <i>S.thermophilus</i> MAS-1,MAS-2 ve MAS-3 amilaz enzim aktivite görüntüsü.	45
Şekil 4.31. <i>S.thermophilus</i> MAS-4 ve MAS-5 amilaz enzim aktivite görüntüsü.	45
Şekil 4.32. <i>S.thermophilus</i> MAS-1,MAS-2 ve MAS-3 likenaz enzim aktivite görüntüsü.	45
Şekil 4.33. <i>S.thermophilus</i> MAS-4 ve MAS-5 likenaz enzim aktivite görüntüsü.	46
Şekil 4.34. <i>S.thermophilus</i> MAS-1,MAS-2 ve MAS-3 proteaz enzim aktivite görüntüsü.	46
Şekil 4.35. <i>S.thermophilus</i> MAS-4 ve MAS-5 proteaz enzim aktivite görüntüsü.	46

Şekil 4.36. <i>S.thermophilus</i> MAS-1,MAS-2 ve MAS-3 selüloz enzim aktivite görüntüsü.....	47
Şekil 4.37. <i>S.thermophilus</i> MAS-4 ve MAS-5 selüloz enzim aktivite görüntüsü. ...	47



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının antibiyotik hassasiyetleri (CLSI).....	20
Çizelge 4.2. <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının antibiyotik hassasiyetleri (CLSI).....	22
Çizelge 4.3. <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının jelatinaz aktiviteleri.	25
Çizelge 4.4. <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının pH 3.0 için canlı sayım sonuçları (log Cfu/mL)......	26
Çizelge 4.5. <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının pH ve safra deney grupları için kontrol canlı sayım sonuçları(log Cfu/mL).	26
Çizelge 4.6. <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının farklı safra konsantrasyonları canlı sayım sonuçları (log Cfu/mL.)	27
Çizelge 4.7. <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının pH 2.0 spektrofotometrik değerleri. ...	27
Çizelge 4.8. <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının pH 2.5 spektrofotometrik değerleri. ...	27
Çizelge 4.9. <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının pH 3.0 spektrofotometrik değerleri. ..	28
Çizelge 4.10. <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının %0.3 safra spektrofotometrik değerleri.	28
Çizelge 4.11. <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının %1 safra spektrofotometrik değerleri.	28
Çizelge 4.12. <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının gıda-insan patojenleri üzerine antimikrobiyal aktiviteleri.	29
Çizelge 4.13. <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının balık patojenleri üzerine antimikrobiyal aktiviteleri.	30
Çizelge 4.14. <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının mayalar üzerine antimikrobiyal aktiviteleri.	31
Çizelge 4.15. <i>S.thermophilus</i> MAS Suşlarının % otoagregasyon değerleri.	31
Çizelge 4.16. <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının çeşitli balık patojenleri ile % koagregasyon yetenekleri.....	33
Çizelge 4.17. <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının gıda-insan patojenleri ile % koagregasyon yetenekleri.	36
Çizelge 4.18. <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının hidrofobisite özellikleri.	38
Çizelge 4.19. <i>S. thermophilus</i> MAS suşlarının nisin dirençliliği.....	39
Çizelge 4.20. <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının antioksidan aktiviteleri.	40
Çizelge 4.21. <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının sodyum benzoat direnç özellikleri (spektrofotometrik).	41
Çizelge 4.22. <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının 0.1mg/mL sodyum benzoata direnç özellikleri (Log Cfu/mL).....	42
Çizelge 4.23. <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının sodyum benzoatlı ortamda asit üretme yetenekleri.	42
Çizelge 4.24. <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının sodyum benzoat direnç özellikleri (spektrofotometrik pH4.5).	43
Çizelge 4.25. <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının sodyum benzoatlı ortamda asit üretme yetenekleri (pH4.5).	43
Çizelge 4.26. <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının 0.1mg/mL sodyum benzoata direnç özellikleri (Log Cfu/mL PH4.5).....	44
Çizelge 4.27. <i>S.thermophilus</i> MAS suşlarının enzim aktiviteleri.....	44

SİMGELER VE KISALTMALAR

AK	Amikasin
APX	Kloksasilin
ATCC	American Type Culture Collection
B	Basitrasin
C	Kloramfenikol
CFU	Colony Forming Unit
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DPPH	α -difenil- β -pikril hidrazil
GIS	Gastro İntestinal Sistem
K	Kanamisin
LAB	Laktik Asit Bakterileri
mL	Milimetre
NA	Nalidiksik Asit
NCCLS	National Committee on Clinical Laboratory Standards
nm	Nanometre
°C	Santigrat Derece
OD	Optik Yoğunluk
OFX	Ofloksasin
P	Penisilin
PB	Polimiksin B
PBS	Phosphate Buffered Saline/ Fosfat Tampon Çözeltisi
PCR	Polymerase Chain Reaction
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
SB	Sodyum Benzoat
SF	Serum Fizyolojik
SXT	Trimethoprim/Sulphamethoxazole
μL	Mikrolitre
μM	Mikrometre

1.GİRİŞ

Laktik asit bakterileri (LAB)'nin gıda endüstrisi ve biyoteknolojik çalışmalarda yaygın şekilde kullanılan önemli mikroorganizmalar olduğu bilinmektedir. Besin içeriği bakımından genel olarak zengin ortamlarda, örneğin süt ve süt ürünlerinde, bitki ve bitki artıklarında, et ve sebzelerde, insan ve hayvan bağırsak mukozasında bulunurlar. Süt içerisinde doğal olarak bulunan mikroorganizma grubu olan LAB fermente süt ürünleri üretiminde starter kültür olarak kullanılmaktadır (Chaves vd., 2002).

Starter kültürler metabolik, fizyolojik, morfolojik özellikleri bakımından bir araya gelerek yoğurt kalitesini önemli ölçüde etkilemektedir (Asmahan, 2011). Geleneksel fermente gıdaların özgün tekstür, aroma ve fiziksel görüntüsünün oluşumunda yöresel hammaddelerin etkisinin yanında, kullanılan LAB'nin türü de oldukça etkilidir.

Yüzlerce yıldır fermentasyon işlemlerinde, yeni besinlerin üretim aşamasında aynı zamanda bozulabilir gıda ürün gruplarını korumak amacıyla LAB sıklıkla kullanılabilmektedir. LAB, gerçekleştirmiş olduğu laktik asit fermentasyonu sonucu fermente gıdalar oluşmaktadır. LAB tarafından gerçekleştirilen fermentasyon işlemi sonrasında kendine özgü aroma, tad ve kokulara sahip yeni besin maddeleri meydana gelmekte, ham materyallerin raf ömrü uzamakta, patojenik veya gıdalarda bozulmalara sebep olan organizmaların gelişimleri önlenmektedir. Neticede gıda endüstrisinde, LAB'nin gelişimi ile birlikte oluşan asidifikasyon ve enzimatik işlemler çeşitli fermente gıdaların tat, koku, aroma ve teksür özelliklerine etki etmektedir (Kıran vd., 2011). Bununla birlikte, üretmiş oldukları peptit yapıdaki "bakteriyosin" molekülü gıdalarda bozulmalara ve gıda kökenli enfeksiyonlara sebep olan bakterilerin gelişimini engellemekte ve böylece gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatmak için potansiyel biyolojik koruyucu görevi görmektedir (Kleanhammer, 1988).

Bakteriyosin molekülü, bakteriler tarafından ribozomal olarak sentezlenen, protein yapıda, antagonistik etkiye sahip olan bileşiklerdir. Bu bileşikler, özellikle üretici türe yakın akraba olan türlere karşı bakteriyostatik veya bakteriyosidal etki gösterirler (James vd.,1996). Farklı özelliklere sahip birçok çeşidinin olmasına rağmen, gıdalarda güvenilir ve yaygın olarak daha çok laktik asit bakterilerinden elde edilen nisin kullanılmaktadır (Chen, Hoover, 2003).

Biyokontrol ifadesi, hem mikroorganizmaların hem de metabolitlerinin gıda raf ömrünün uzatılması veya güvenliğinin sağlanması amacıyla kullanılmasını ifade etmektedir (Hugas, 1998). LAB biyokontrol amacıyla en yaygın şekilde kullanılan mikroorganizma grubudur. LAB gram pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmeyen, kok/basil/kokobasil şeklinde, termofilik ve mezofilik özellikte olabilen bakterilerdir (Axelsson, 1998). LAB, fonksiyonel özelliklerinin yanında gıda güvenliği açısından da büyük önem taşımaktadır. LAB gıda ortamındaki yüksek besin rekabeti ve ürettikleri antimikrobiyal bileşiklerle bozulma ve hastalık etkeni mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Gilliland, 1990).

Yeni doğanların immün (bağışıklık) sistemini oluşturan maddeler yetişkin bir bireyin yüzde bir ila ikisi kadardır (Hanson ve Korotheva, 2002). Bu nedendir ki anne sütü, bebeğin immün sisteminin hızlı bir şekilde gelişmesi için en önemli kaynaktır. Anne sütünün, anneden çocuğa birçok temel besin maddesinin taşınması için önemli bir araçtır. Anne sütü çocuğun büyümesi ve gelişmesi için gerekli besinleri içermekle beraber mikrobiyolojik korumayı, bağışıklık sisteminin olgunlaşmasını, düzenlenmesini, aynı zamanda sindirim sisteminin de doğum sonrası olgunlaşmasını sağlar (Weaver, 2003).

Yapılan araştırmalar sonucu patojen olmayan mikroorganizmaların, insan vücudundaki immunoglobulin seviyesini arttırdığı, böylece vücut savunma mekanizmasının da daha hızlı geliştiği gösterilmiştir. Bu etkiyi yaratan mikroorganizmalardan en önemlileri laktik asit bakterileridir (Claridge, 2006). Anne sütü üzerine yapılan mikrobiyolojik çalışmaların çoğu, anne sütü içeriğinde bulunan ve anne sütü aracılığıyla 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 sütü yeni doğanlarda sağlıklı ve hızlı bir gelişim için gerekli olan, zengin besin değeri ve kompleks mikrobiyal içeriği ile gastrointestinal sisteminin olgunlaşmasını ve immun sistemin gelişmesini sağlayan eşsiz spesifik bir biyolojik sıvı olarak tanımlanmıştır (Fernández vd., 2013). Sağlıklı kadınların sütleri yaklaşık 10^3 - 10^4 Cfu/mL potansiyel bakteriyi yeni doğanların gastrointestinal sistemine sürekli bir kaynak olarak aktarmaktadır. Bu anlamda anne sütü mikrobiyomları yaşamın başlangıcında steril olan gastrointestinal sistem için bir aşı olarak kabul edilmektedir. Anne sütü yapısında bulunan çeşitli vitamin, mineral, hormonlar, oligosakkaritler, glikoproteinler, yağ asitleri gibi biyoaktif faktörleri içermesinin yanı sıra ayrıca probiyotik özellik taşıyan (özellikle *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium*) mikrobiyal çeşitliliği ile çeşitli kronik hastalıklar, diş çürükleri, obezite, alerjik hastalıklar, diyabet, ülseratif kolit, enfeksiyonel hastalıklar ve lösemiye karşı koruyarak bedensel ve zihinsel gelişimi sağlamaktadır. Yapılan birçok çalışmada 16S rDNA genleri üzerinde moleküler tabanlı genetik identifikasyon teknikleri ile anne sütü mikrobiyomunda *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* grubu bakterilerin ağırlıklı olarak bulunduğu ve günlük 1.10^5 - 1.10^7 civarında bakterilerin anne sütü aracılığı ile gastrointestinal sisteme transfer edildiği tespit edilmiştir (Soto vd., 2014).

Bu çalışma kapsamında anne sütünden izole edilen beş adet *S.thermophilus* MAS suşunun, PCR tanımlama yöntemi ile moleküler olarak identifikasyonu yapılarak, biyoproseslerde probiyotik kültür olarak faydalanma potansiyelinin belirlenmesi amacıyla güvenilirlik testleri (antibiyogram, hemolitik aktivite, jelatinaz aktivite) ve teknolojik özelliklerinin belirlenmesi kapsamında asit ve safra direnç özellikleri, antimikrobiyal aktivite, antioksidan aktivite, agregasyon özellikleri, nisin dirençliliği, hidrofobisite, enzim aktiviteleri (amilaz, likenaz, selülaz ve proteaz) ve sodyum benzoat direnç özelliklerini belirlemek amacıyla in vitro koşullarda araştırmalar yapılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Laktik Asit Bakterileri

Biyoteknolojik çalışmalarda çok sık olarak kullanılan LAB, fermente ürünlerin üretim ve olgunlaştırılmasında, endüstriyel gıda fermentasyonunda, süt endüstrisinde ve gıda teknolojisinde kapsamlı olarak kullanılan mikroorganizma grubu olması dolayısıyla büyük önem taşımaktadır. LAB beslenmeye katkıda bulunmada, besin ürünlerinin sağlık ve duyu özellikleri ve hayvan yemlerinde kullanılması nedeni ile büyük öneme sahiptir. Gıda üretimindeki önemi dolayısıyla son yirmi yılı aşkın süredir LAB' ne olan bilimsel ilgi artmış ve konu ile ilgili çeşitli araştırmalar yapılmıştır (Schaafsma, 2002).

LAB'nin yaygın şekilde endüstriyel uygulamalarda *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* cinsi türleri yaygın olarak süt fermentasyonunda kullanılırlar (De Vuyst ve Tsakalidou, 2008). LAB'ni ihtiva eden süt ürünlerine kendine has aroma, koku, tat ve yapısal özellik kazandırılmasında yardımcı olmaktadır. Oluşan LAB'nin meydana getirdiği metabolitler ve bakteriyosin yardımıyla bazı patojenlerin inhibisyonu da sağlanmaktadır (Etöz, 2006).

LAB, gram-pozitif, spor oluşturmeyen, katalaz negatif, aerotolerant (mikroaerofilik koşullardan anaerobik koşullara kadar değişen geniş bir spektrumda gelişebilen), karbonhidrat metabolizmaları sonucunda başlıca son ürün olarak laktik asit oluşturan mikroorganizmalar olarak kabul edilmektedirler (Klein vd., 1998; Gürsoy ve Kınık, 2005). LAB'nin en önemli cinsleri; *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium* ve *Tetragenococcus* (Gürsoy ve Kınık, 2005). LAB' nin çoğu insan, hayvan ve bitki gibi doğal ortamlardan izole edilebilirler ve doğal yetiştirme ortamlarında (örneğin süt, vajina, sıcakkanlıların bağırsağı, feçes, dudaklar, meyve veya sebzelerde) bulunurlar (Çakır, 2003). Bazı LAB'nin canlıların gastrointestinal sistemlerinde canlı olarak varlıklarını sürdürebilme özellikleri onların potansiyel probiyotik olarak kullanımlarına olanak sağlamaktadır.

LAB'nin hiçbir üyesi, içinde sadece glukoz ve amonyum bulunan bir mineral besiortamında gelişmez. Pek çoğu vitaminlerden bir ya da birden fazlasına gerek duyarlar. Ayrıca, amino asit istekleri de çok fazladır (Vural, 1998; Klaenhammer ve Kullen, 1999).

2.2 Streptococcus Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri

LAB grubunda yer alan *Streptococcus* cinsi bakteriler *Streptococcaceae* familyasına ait olmakla birlikte gram pozitif, katalaz negatif, fakültatif anaerobik, bazı türleri mikroaerofilik mikroorganizmalardır (Sneath vd.,1986). Fermentatif metabolizmaları mevcut olup homofermentatif olarak glukozu (L+) laktik asite dönüştürürler. Bazı türleri malik ve sitrik asit gibi organik asitleri serin ve arginin gibi aminoasitleri fermente ederler, 10°C'de gelişmez, 45°C'de gelişir, %6.5 NaCl çözeltisinde, 9.6 pH ve %0.1 metilen mavili sütte gelişim göstermezlerken, arjininden NH₃ oluşturmazlar. Beta hemolitik negatiftirler. Ayrıca bu cinsin en önemli temsilcisi *S.thermophilus*' dur (Kılıç, 2001).

S. thermophilus'un insan kökenli olmamasına rağmen mide asidi koşullarına dayanıklı olduğu bilinmekte, hatta mide bağırsak geçidinde hayatta kaldığı ve bağırsak epitel hücrelerine yapışma yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (Brigidi vd., 2003; Lick vd., 2001; Mater vd., 2005; Elli vd., 2006).

Yoğurt simbiyozisinin insan sağlığındaki önemli etkilerine inanılmaktadır. Örneğin; laktoz intoleransının azaltılmasındaki rolü çok iyi bilinmektedir. Yoğurt bakterileri olarak bilinen *S.thermophilus* ve *L.delbrueckii* gastrointestinal sistem yolu (GİS) boyunca yaşayabilirliği önemli bir noktadır. Mater vd., (2005) yapmış olduğu çalışmada her iki bakterinin insan feçesinde yaşayabilirliği seçici kültür ortamlarında gösterilmiştir. Bu deneydeki gönüllüler 3 ay boyunca antibiyotik kullanmamış herhangi bir gastrointestinal sistem hastalığı bulunmayan, kronik ishal, kabızlık, alerji ve gıda intoleransı olmayan sağlıklı bireylerden oluşmaktadır. Bu bireyler 12 gün boyunca *S.thermophilus* ve *L.delbrueckii* içeren probiyotikli yoğurt tüketmişler ve *S.thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* feçeslerinde PCR ile tespit edilmiştir. Bu çalışma yoğurtta bulunan *S.thermophilus* ve *L.delbrueckii*'nin probiyotik olarak kullanılabilirliği ve probiyotik etkilerinin faydalı olacağını göstermektedir.

Iyer vd., (2010) yapmış olduğu çalışmada ise yüksek derecede folat üreten *S.thermophilus* RD102 ve RD104 suşlarının probiyotik potansiyelleri üzerinde durulmuştur. Bu suşlar düşük pH değerlerine, safra tuzlarına dirençli ve pek çok antibiyotiğe hassas suşlardır. Doğal bariyerlere olan dirençleri ve vücudun ihtiyaç duyduğu folatı yüksek düzeyde üretmeleri nedeniyle probiyotik olarak kullanımları önerilmektedir.

Correa vd ., (2005) yapmış olduğu çalışmada 15 gün boyunca antibiyotik uygulanan 80 yenidoğana (6 aylıktan 36 aylığa kadar), 30 gün boyunca *Bifidobacterium lactis* ve *S. thermophilus* verilmiştir. Antibiyotik kullanan yenidoğanların %20'sinde antibiyotiğe bağlı ishal bulunmaktadır. Antibiyotiğe bağlı ishal genelde çabuk iyileşmekte olmasına rağmen, bazen 6 haftadan uzun süren ve hastanın hayatını tehdit edebilen ciddi bir durumdur. Bu tablonun oluşmasında bağırsak florasının bozulması ana etkindir. Bu çalışma sonucunda yeni doğanlarda antibiyotik kaynaklı ishal tablosunda probiyotik kullanımının ishal süresini, şiddetini, ishale bağlı sıvı kaybı miktarını anlamlı derecede azalttığı ve yine antibiyotiğe bağlı olan, gastrointestinal sistemde istenmeyen yan etkileri anlamlı derecede azalttığı görülmüştür. Bu nedenle yeni doğanlarda probiyotik kullanımının önemi üzerinde durulmuştur ve ileride kullanımının yaygınlaşacağı düşünülmektedir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 *S.thermophilus* MAS Suşlarının Genetik Olarak Tanımlanması

Daha önce yürütülen bir proje dahilinde farklı gönüllü annelerden alınan sütlerden izole edilen beş adet *S.thermophilus* suşunun, hizmet alımı yapılarak PCR tabanlı moleküler tanımlama yöntemi ile genetik identifikasyonu yapılmıştır. Nittalab (Ankara/Türkiye) tarafından tanımlanan örneklerin PCR reaksiyonunda; 50uL hacimde 1X Taq Buffer, 1.5mm MgCl, 0.2mm dNTP, 0.4 pmol 27F ve 907R primerler (27F 5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG- 3' / 907R 5'- CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3') ve 1.25 U Taq polimeraz (Thermo) kullanılmıştır. 94°C'de 5 dk + 30 X (94 °C'de 30s + 50 °C'de 30s + 72 °C'de 45s) yapılmıştır. DNA dizi analizi: Bigdye Cycle Sequencing Kit kullanılıp ve sekanslar ABI 3130 xl Genetik Analyzer da yürütülmüştür. Biyoinformatik analiz için de MEGA phylogenetic Software kullanılmıştır.

S.thermophilus suşları Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi, Biyoteknoloji Laboratuvarı bünyesinde ve M17 sıvı/katı besiyerlerinde pasajları alınarak gliserol stoklarda +4°C muhafaza edilmiştir.

3.2 Güvenilirlik Testleri

3.2.1 Antibiyogram

Antibiyotiklere olan dirençlilik ve hassasiyeti belirlemek üzere anne sütünden izole edilip, genetik olarak karakterizasyonu yapılan *S. thermophilus* MAS suşlarının Beta Laktam grubu (Penisilin G, Basitrasin, Kloksasilin), Kinolon grubu (Ofloksasin, Nalidiksik Asit), Aminoglikozid grubu (Amikasin, Kanamisin), Kloramfenikol grubu (Kloramfenikol), Polimiksin B ve Trimethoprim olmak üzere mikroorganizma kaynaklı hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılan on adet klinik ticari antibiyotiğe karşı hassasiyetleri disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Gliserol stoklarda muhafaza edilen *S.thermophilus* MAS suşları M17 sıvı besiyerinde iki kez aktifleştirilmiş ve aktif kültürlerinin hücre yoğunlukları serum fizyolojik çözeltisi (SF: % 0.865 g NaCl) içerisinde Mc Farland 0.5 sistemi esas alınarak ayarlanmıştır.

Konsantrasyonu ayarlanan *S.thermophilus* MAS suşları M17 agar besiyerine 100µL inoküle edilmiş ve steril drigalski spatülü ile yayma ekim yapılmıştır. Ekimleri yapılan M17 agar petrileri üzerine her bir antibiyotik diski üçer tekrarlı olacak şekilde konuşlandırılmış ve ardından 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda antibiyotik diskleri etrafında oluşan inhibisyon zon çapı değerleri kumpas ölçüm cihazı yardımı ile ölçülmüş ve sonuçlar CLSI (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü) 2012’ye göre değerlendirilmiştir (Sharma vd., 2016).

3.2.2 Hemolitik aktivite

S.thermophilus MAS suşlarının hemoliz enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla M17 broth besiyerinde iki kez aktifleştirilmiş ve Colombia koyun kanlı agara (OR-BAK) çizgi ekim yapılmıştır. Ekimleri yapılan test grubu bakteriler uygun sıcaklık koşullarında 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda oluşan kolonilerin etrafında yeşil zon oluşumu α -hemolitik, berrak zon oluşumu beta hemolitik, zon oluşumu gözlenmeyen laktik asit bakterileri gama hemolitik olarak değerlendirilmiştir (Eryılmaz, 2011).

3.2.3 Jelatinaz aktivitesi

S.thermophilus MAS suşlarının jelatinaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla aktifleştirilen kültürlerden jelatin içeren (30 g/L jelatin) M17 besi yerine çizgi ekim yapılmış ve uygun sıcaklık koşullarında 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası petriler +4°C’de 5 saat inkübe edilmiştir. Kolonilerin etrafındaki bulanık bölge pozitif olduğunu belirtmektedir (Harrigan ve McCance, 1990).

3.3 *S.thermophilus* MAS Suşlarının Bazı Biyoteknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

3.3.1 *S.thermophilus* MAS suşlarının düşük pH toleranslarının belirlenmesi

S.thermophilus MAS suşlarının farklı pH değerlerine toleransının belirlenmesi için 3.0M HCl yardımı ile pH değerleri 2, 2.5, 3 olan M17 broth ve kontrol grubu olarak kullanılmak üzere M17 broth besiyerleri hazırlanmıştır. *S.thermophilus* MAS kültürlerinden pH değerleri ayarlanmış steril M17 ve kontrol grubu M17 besiyerlerine iki tekerrürlü olacak şekilde %1 oranında inokülasyon yapılmış ve 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 0 ve 3. saatlerinde 600nm’de spektrofotometrik ölçüm yapılmış ve ayrıca bu saatlerde SF çözeltilisine %1 oranında laktik asit bakteri kültürleri (900µL SF+ 100µL laktik asit bakteri kültürü) inoküle edilerek 10⁻¹ oranında seri dilüsyonlar oluşturulmuştur. Dilüsyon tüplerinden çift tekerrürlü olacak şekilde M17 agar besiyerlerine 100µl inokülasyon yapılmış ve anaerobik koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda deney ve kontrol gruplarında koloni sayımı yapılmış ve bu değerler Log (Cfu/mL) cinsinden hesaplanmıştır (Zoral, 2013).

3.3.2 *S.thermophilus* MAS suşlarının safra toleranslarının belirlenmesi

S.thermophilus MAS suşlarının safra suyu toleransı spektrofotometrik ve canlı hücre sayımı yöntemleri ile belirlenmiştir. Bu amaçla %0.3 ve %1 oranında safra (Oxoid) içeren M17 broth ve kontrol olarak kullanılmak üzere safra içermeyen M17 broth besiyeri hazırlanmıştır. LAB, deney ve kontrol gruplarına çift tekrarlı olacak şekilde %1 oranında inoküle edilmiştir ve 37°C’de dört saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 0. ve 3. saatlerinde 600nm’de spektrofotometrik ölçüm ve ayrıca bu saatlerde SF çözeltililerine seri dilüsyonlar yapılmıştır. Dilüsyon tüplerinden iki tekerrürlü olacak şekilde M17 agar besiyerlerine ekim yapılmış ve anaerobik koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda deney ve kontrol gruplarında koloni sayımı yapılmış ve bu değerler Log (Cfu/mL) cinsinden hesaplanmıştır (Tokatlı, 2013).

3.3.3 *S.thermophilus* MAS suşlarının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi

S.thermophilus MAS suşlarının belirlenen test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde kuyu difüzyon metodu uygulanmıştır.

3.3.3.1 Test mikroorganizmalarının hazırlanması

S.thermophilus MAS suşlarının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde on altı adet insan ve klinik kökenli bakteri (*Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Bacillus megaterium* (Pasteur Ens.5117), *Bacillus cereus* RSKK 863, *Bacillus subtilis* RSKK 244, *Salmonella enteritidis* RSKK 171, *Micrococcus luteus* NRRL B-4375, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Shigella sonnei* MU:57, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Yersinia enterocolitica* ATCC 11175, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ve *Staphylococcus epidermidis* ATCC 11228), yedi adet balık patojeni (*Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum* M1, *Vibrio anguillarum* A4, *Aeromonas hydrophila* ATCC 19570, *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri*, *Streptococcus agalactiae*) ve 2 adet maya (*Candida albicans* ATCC 10231 ve *Candida glabrata* RSKK 04019) kullanılmıştır.

Test mikroorganizmaları uygun besiyerlerinde ve sıcaklıklarda iki kez aktiveleştirilmiş ve 5mL'lik serum fizyolojik çözeltisi içerisinde yoğunlukları Mc Farland 0.5 standardı esas alınarak ayarlanmıştır. Mc Farland'ları ayarlanan mikroorganizmalar deneyde kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.3.3.2 *S.thermophilus* MAS kültürlerinin hazırlanması

S.thermophilus MAS suşlarının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde 18-24 saatlik aktif *S.thermophilus* MAS suşlarının süpernatantları kullanılmıştır. *S.thermophilus* MAS kültürleri bu amaçla 5000rpm'de 15 dakika santrifüj işlemine tabii tutularak bakteri süpernatantları peletlerden ayrılmıştır. *S.thermophilus* MAS kültürlerinin süpernatantları 0.2 µm'lik mikro filtreler yardımı ile filtre edilerek steril cam tüpler içerisine alınmış ve deneyde kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.3.3.3 Metodun uygulanması

Kuyu difüzyon metodunun uygulanmasında Mc Farland 0.5 esas alınarak konsantrasyonları ayarlanmış patojen test mikroorganizmaları, gelişimleri için spesifik olan katı besiyerlerine 100µL inoküle edilmiş ve drigalski spatülü yardımı ile yayma ekim yöntemi ile ekimleri yapılmıştır.

Ekimi yapılan mikroorganizmaların katı besiyerleri üzerine 7 mm çapında üç tekrarlı olacak şekilde kuyucuklar açılarak *S.thermophilus* MAS suşlarının süpernatantları 100µL olacak şekilde yüklenmiştir. Ekimleri tamamlanan patojen mikroorganizmaların gelişimi için uygun sıcaklıklarda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda kuyucuklar etrafında oluşan inhibisyon zon değerleri kumpas ölçüm cihazı yardımı ile ölçülmüş ve elde edilen veriler, inhibisyon zon çapı değeri < 8mm (±), inhibisyon zon çapı değeri 8-10mm (+), inhibisyon zon çapı değeri > 10mm (++) ve inhibisyon zon çapı gözlenmeyenler ise (-) olarak değerlendirilmiştir (Campana vd., 2012).

3.3.4 *S.thermophilus* MAS suşlarının agregasyon özelliklerinin belirlenmesi

3.3.4.1 Otoagregasyon özelliklerinin belirlenmesi

MAS suşlarının otoagregasyon yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla şu aşamalar izlenmiştir:

M17 sıvı besiyerinde iki kez aktiveleştirilmiş *S. thermophilus* MAS suşları 5000rpm'de 15 dakika santifrüj işlemi uygulanarak çöktürme işlemine tabii tutulmuştur. Üstte kalan süpernatant kısmı uzaklaştırılmış ve pelet kısmı PBS tampon çözeltisi ile iki kez yıkanmıştır. Peletler PBS tampon çözeltisi içeren tüpler içerisinde hücre süspansiyon konsantrasyonları 600nm'de 0.6 ± 0.02 olacak şekilde süspanse edilerek ayarlanmıştır. Konsantrasyonları ayarlanan *S. thermophilus* MAS suşları steril tüplere 2'şer mL üç tekrarlı olacak şekilde alınmış ve vortexlenmiştir. Ardından tüpler hareket ettirilmeden 37°C'de 4 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. *S.thermophilus* MAS suşlarının bekletme öncesi optikal dansite değerleri kaydedilmiştir. Dört saatlik süre sonunda

bakteri kültürlerinin üst kısmından başka bir deney tüpüne hassas bir şekilde 0.1mL alınarak, 3.9mL PBS tampon çözeltisi ile süspanse edilmiştir. Örneklerin OD değerleri 600nm’de spektrofotometrik ölçüm yapılmış ve bekletme sonrası değerleri kaydedilmiştir. Körv tüp olarak boş PBS tampon çözeltisi kullanılmıştır.

Otoagregasyon değerinin yüzde olarak belirlenmesinde aşağıdaki formül kullanılmıştır;

$$\% \text{ Otoagregasyon} = [(OD1 - OD2) / OD1 \times 100] \quad (3.1)$$

OD1: Bekletme öncesi optikal dansite, OD2: Bekletme sonrası optikal dansite.

S.thermophilus MAS suşlarının oto-agregasyon özellikleri mikroskopik olarak da gözlenmiştir. Bu amaçla 4 saat inkübe edilen *S.thermophilus* MAS suşları tüplerin dip kısmından mikropipet yardımı ile alınarak gram boyama işlemi uygulanmıştır. Ardından ışık mikroskobu altında incelenmiştir (Tomás vd., 2005).

3.3.4.2 Koagregasyon özelliklerinin belirlenmesi

S.thermophilus MAS suşlarının koagregasyon özelliklerinin belirlenmesinde test mikroorganizmaları olarak 7 adet gıda-insan kaynaklı mikroorganizma (*B.cereus* RSKK 863, *B.megaterium* 5117, *B.subtilis* RSKK 244, *Y.enterocolitica* ATCC 11175, *Shigella sonnei* MU:57, *S.aureus* ATCC 25923, *P.aeruginosa* ATCC 27853), 7 adet balık (*A.hydrophila*, *S.agalactiae*, *V.alginolyticus*, *V.anguillarum* M1, *V.anguillarum* A4, *L.garvieae*, *Y.ruckeri*) patojeni kullanılmıştır.

S.thermophilus MAS suşları ve test mikroorganizmaları 5000rpm’de 15 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Üstte kalan süpernatant kısım uzaklaştırılmış ve peletler PBS tampon çözeltisi ile iki kez yıkanmıştır. Peletler PBS tampon çözeltisi içeren tüpler içerisinde hücre konsantrasyonları 600nm’de 0.6 ± 0.02 olacak şekilde süspanse edilerek ayarlanmıştır ve bekletme öncesi değerler olarak kaydedilmiştir. Yoğunlukları ayarlanan test bakterileri ve laktik asit bakterileri çözeltilerinden steril tüplere üç tekrarlı olacak şekilde eşit miktarlarda alınmış ve vortex cihazı yardımı ile karıştırılarak homojenize edilmiştir. Karışık bakteri kültürlerini içeren tüpler 37°C’de hareket ettirilmeden dört saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda

tüplerin üst fazından 0.1mL alınarak 3.9mL PBS tampon çözeltisi ile süspanse edilmiştir. Örneklerin OD değerleri 600nm’de ölçülerek bekletme sonrası değerleri olarak kaydedilmiştir. Körv tüp olarak boş PBS tampon çözeltisi kullanılmıştır. Koagregasyon değerinin yüzde olarak belirlenmesinde aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$[OD600 (S.thermophilus_{yalnız} + Patojen Test Mikroorganizması_{yalnız})/2] -$$

$$\frac{OD600 (S.thermophilus + Patojen Test Mikroorganizması_{karışık kültür})}{OD600 (S.thermophilus_{yalnız} + Patojen Test Mikroorganizması_{yalnız})/2} \times \%100 \quad (3.2)$$

Karışık kültürlerin dip kısmından, bekletme sonrası mikropipet yardımı ile alınarak gram boyama işlemi uygulanmış ve *S.thermophilus* MAS suşlarının koagregasyon özellikleri ışık mikroskobu altında incelenmiştir (Ouweland vd., 2000).

3.3.5 *S.thermophilus* MAS suşlarının hidrofobisite özelliklerinin belirlenmesi

S.thermophilus MAS suşlarının hidrofobisitelerinin belirlenmesi için %0.03 Kongo kırmızısı karıştırılmış TSA agar hazırlanmıştır. *S.thermophilus* MAS suşları kongo kırmızısı içeren TSA’ya ekilip ve 37°C’de 24 saat inkübasyona(anaerobik koşullarda) bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda koloniler renklerine göre değerlendirilmiştir. Kırmızı koloniler pozitif (hidrofobik), beyaz veya renksiz koloniler ise negatif (non-hidrofobik) olarak kabul edilmiştir (Sharma vd., 2006).

3.3.6 *S.thermophilus* MAS suşlarının nisin dirençliliğinin belirlenmesi

S.thermophilus MAS suşlarının nisine karşı gösterdikleri duyarlılık veya dirençlilikleri agar difüzyon yöntemi kullanılarak Tsai ve Sandine (1987)'ye göre belirlenmiştir. *S.thermophilus* MAS suşları iki kez M17 sıvı besi ortamında 37 °C'de aktifleştirilmiştir. Aktif kültürlerin optikal yoğunlukları (OD) spektrofotometre 600nm de 0.6 ± 0.02 'ye ayarlanmıştır. OD değerleri ayarlanan kültürlerden 100µL alınıp, katı besi ortamına ilave edilmiştir. İlave edilen kültürler besi ortamının yüzeyinde dağılımı homojen bir şekilde sağlanmıştır. 0.02N HCl'de 10 mg/mL olacak şekilde stok Nisin çözeltisi hazırlanmıştır. *S.thermophilus* MAS suşlarının nisine karşı gösterdikleri duyarlılık veya dirençliliklerini belirlemek amacıyla, 1.25 – 2.5 – 5 – 10– 20– 25 – 50 – 100 – 150 µg/mL'lik farklı konsantrasyonlarda nisin stokları hazırlanmıştır. Besi ortamında 0.3mm çapındaki steril delgeç çubuk yardımıyla 9 farklı nisin konsantrasyonu için kuyular açılarak nisin çözeltileri kuyulara 30µL inoküle edilmiştir. Petriler, 37°C'de anaerobik koşullarda 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda farklı konsantrasyonlarda nisin içeren kuyuların etrafındaki inhibisyon zon çapları kumpas yardımı ile ölçülerek, *S.thermophilus* MAS suşlarının nisine karşı göstermiş oldukları duyarlılık veya dirençlilikleri tespit edilmiş ve kaydedilmiştir.

3.3.7 *S.thermophilus* MAS suşlarının antioksidan aktivitenin belirlenmesi

S.thermophilus MAS suşlarının antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde α - difenil- β -pikril hidrazil (DPPH) serbest radikalini süpürme ve demir iyonu şelatlama metotları uygulanmıştır.

Laktik asit bakteri hücre süspansiyonlarının yoğunlukları her iki metot için de Mc Farland 0.5 standardına göre ayarlanarak kullanılmıştır.

3.3.7.1 *S.thermophilus* MAS kültürlerinin hazırlanması

Uygun besi yerinde iki kez aktifleştirilmiş *S.thermophilus* MAS suşlarının konsantrasyonları steril PBS tampon çözeltisi içerisinde 0.5 Mc Farland standardı esas alınarak ayarlanmıştır.

Mc Farland hazırlanan *S. thermophilus* MAS suşlarından steril koşullarda eppendorf tüplere 1'er mL alınarak 5000rpm' de 15 dakika santrifüj işlemi uygulanarak çöktürülmüştür. Çöktürme sonrası *S.thermophilus* MAS suşlarının supernatantları uzaklaştırılmıştır. *S.thermophilus* MAS suşlarından elde edilen peletler 1mL PBS tampon çözeltisi ile iki kez yıkanmış ve 0.5 Mc Farland standardı esas alınarak 10mL PBS ile resüspanse edilmiştir.

3.3.7.2 DPPH radikali süpürme özelliklerinin belirlenmesi

DPPH indirgeme metodu, mor renkli DPPH serbest radikalının antioksidan özellik taşıyan bir maddeden proton (hidrojen) alarak indirgenmesi ve reaksiyon sonucu mor rengin sarıya dönüşmesi esasına dayanır (Mishra vd., 2015). Ticari DPPH radikali hassas terazi yardımı ile 0.002g tartılarak 100mL metanol içerisinde çözünmesi sağlanmıştır. Hazırlanan DPPH çözeltisinin (0.2mm) aktivitesini yitirmemesi için ışık görmeyecek bir şişede muhafaza edilmesine ve taze şekilde kullanımına özen gösterilmiştir. Hücre konsantrasyonu ayarlanan laktik asit bakterileri solüsyonlarından üç tekrarlı olacak şekilde cam tüplere 0.8mL eklenerek üzerine 1mL DPPH çözeltisi eklenmiştir. Ardından tüpler vorteks yardımı ile karıştırıldıktan sonra reaksiyonun gerçekleşmesi amacıyla oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 30 dakika bekletilmiştir. Reaksiyon süresi sonunda tüplerdeki DPPH serbest radikalının mor renginin laktik asit bakterileri tarafından giderilmesine göre antioksidan aktivite yorumlanmış ve ayrıca tüplerdeki örnekler spektrofotometrede 517nm dalga boyunda okuma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Spektrofotometrik ölçüm sırasında körv tüp olarak boş PBS tampon çözeltisi ve kontrol grubu olarak ise 0.8mL boş PBS+ 1mL DPPH çözeltisi kullanılmıştır.

S.thermophilus MAS suşlarının % DPPH serbest radikali süpürme aktiviteleri aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır (Lin ve Chang, 2000).

$$\% \text{ DPPH süpürme kapasitesi} = 1 - \text{OD2} / \text{OD1} \times 100 \quad (3.3)$$

OD2: örnek optik yoğunluğu, OD1: (PBS+ DPPH) optik yoğunluğu.

3.3.7.3 Demir iyonu şelatlama aktivitelerinin belirlenmesi

Demir iyonu şelatlama metodu, kırmızı renkli Fe^{2+} - ferrozin kompleksinin antioksidan bir ajan tarafından indirgenmesine, reaksiyon sonucunda elektron transferinin inhibe edilmesi, oksidasyon reaksiyonunun durdurulması ve kırmızı rengin süpürülmesi esasına dayanır (Soler-Rivas vd., 2000).

S.thermophilus MAS suşlarının demir iyonu şelatlama aktivitesini belirlemek amacı ile Ferrozine (5mm) ve $FeCl_2$ (2mm) çözeltileri hazırlanmıştır. Hücre yoğunlukları ayarlanan laktik asit bakteri süspansiyonundan üç tekrarlı olacak şekilde cam tüpler içerisine 1'er mL alınmış ve ferrozin çözeltisinden 0.2mL ve $FeCl_2$ çözeltisinden 0.05mL eklenerek tüpler vortexlenmiştir. Örnekler spektrofotometrede 562nm dalga boyunda okutulmuştur.

Spektrofotometrik ölçüm sırasında körv olarak boş PBS tampon çözeltisi ve kontrol grubu olarak 1mL PBS + 0.05mL $FeCl_2$ + 0.2mL Ferrozin çözeltisi kullanılmıştır.

S.thermophilus MAS suşlarının % demir iyonu şelatlama aktivitesi aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır (Abubakr vd., 2012).

% Demir İyonu Şelatlama Aktivitesi;

$$\frac{\text{Kontrol optik yoğunluğu} - \text{Örnek optik yoğunluğu}}{\text{Kontrol optik yoğunluğu}} \times 100 \quad (3.4)$$

3.3.8 *S.thermophilus* MAS suşlarının sodyum benzoat direnç özelliklerinin belirlenmesi

S.thermophilus MAS suşlarının sodyum benzoat gıda katkı maddesine direnç özellikleri spektrofotometrik ve canlı hücre sayımı ile belirlenmiştir. Bu amaçla %0.015 ile %1 aralığında on farklı sodyum benzoat konsantrasyonuna sahip M17 broth ve kontrol grubu olarak kullanılmak üzere M17 broth besiyerleri hazırlanmıştır. Laktik asit bakteri hücre yoğunlukları Mc Farland 0.5 standardı esas alınarak ayarlanmıştır. Yoğunluğu ayarlanan laktik asit bakteri kültürleri farklı

konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren ve içermeyen besiyerlerine %1 oranında inoküle edilerek 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda hücre yoğunlukları (OD) 600nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Canlı hücre sayımı yapmak amacıyla %0.1 konsantrasyonunda sodyum benzoat içeren M17 broth ve kontrol grubu olarak M17 broth besiyerlerinde geliştirilen laktik asit bakteri kültürleri kullanılmıştır. Test ve kontrol grubu bakteriler SF içerisinde 10^{-1} oranında seyreltilerek 10^{-1} - 10^{-8} aralığında seri dilüsyonlar oluşturulmuştur. Laktik asit bakteri dilüsyonlarından iki tekerrürlü olacak şekilde M17 agar besiyerine 100µL inoküle edilerek yayma ekim yapılmış ve anaerobik koşullarda 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda deney ve kontrol gruplarında koloni sayımı yapılmış ve bu değerler Log (Cfu/mL) cinsinden hesaplanmıştır (Gümüştekin, 2010).

3.3.9 *S.thermophilus* MAS suşlarının enzim aktivitelerinin belirlenmesi

3.3.9.1 *S.thermophilus* MAS suşlarının amilaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Amilaz aktiviteleri belirlenmek üzere %0.5 nişasta ihtiva eden Nutrient agar besiyerine spot ekim yöntemi uygulanmıştır. İlgili besiyerlerinde iki kez aktiveleştirilmiş *S.thermophilus* MAS suşları 9000rpm’de 15dk santrifüj edilerek süpernatantları Nutrient agar besiyerine 20 ve 50µL olmak üzere iki ayrı konsantrasyonda spot ekim yöntemi ile damlatılmış 37°C’de bir saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon periyodu sonunda spot ekim yapılan besiyerlerinin tüm yüzeyi iyodin boyası ile kaplanacak şekilde boyama yapılmıştır. Spot damlatma yapılan kısımlarda beyaz zon oluşumu amilaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Rezzukoğlu, 2011).

3.3.9.2 *S.thermophilus* MAS suşlarının likenaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

S.thermophilus MAS suşlarının likenaz aktivitelerini belirlemek amacıyla %0.1 oranında likenan kullanılmıştır. İlgili besiyerlerinde iki kez aktiveleştirilmiş *S.thermophilus* MAS suşları 9000rpm’de 15 dk. santrifüj edilerek süpernatantları likenan içeren besiyerine spot ekim yapılmış 37°C’de bir saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon periyodu sonunda spot ekim yapılan besiyerlerinin tüm

yüzeyi kongo-red boyası ile kaplanacak şekilde boyama yapılmıştır. Spot damlatma uygulanan kısımlarda sarı zon oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.3.9.3 *S.thermophilus* MAS suşlarının proteaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

S.thermophilus MAS suşlarının proteaz enzim aktivitesini belirlemek amacı ile %7 ve %10 oranlarında skim milk ihtiva eden agar besiyerine 9000rpm’de 15dk. santrifüj edilerek süpernatantları spot ekim yöntemi uygulandıktan sonra 37°C’de bir saat inkübasyona bırakılmıştır.

3.3.9.4 *S.thermophilus* MAS suşlarının selüloz enzim aktivitesinin belirlenmesi

S.thermophilus MAS suşlarının selüloz aktivitelerini belirlemek amacıyla %0.1 oranında selüloz (CMC) kullanılmıştır. İki kez aktiveleştirilmiş *S.thermophilus* MAS suşları 9000rpm’de 15dk. santrifüj edilerek süpernatantları likenan içeren besiyerine spot ekim yapılmış 37°C’de bir saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon periyodu sonunda spot ekim yapılan besiyerlerinin tüm yüzeyi kongo-red boyası ile kaplanacak şekilde boyama yapılmıştır. Spot damlatma uygulanan kısımlarda sarı zon oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 *S.thermophilus* MAS Suşlarının Genetik Olarak Tanımlanması

S.thermophilus 'un PCR tabanlı genetik olarak tanımlanması sonucunda bu suşların *S.thermophilus* olduğu onaylanmıştır. Bu suşlara *S.thermophilus* MAS-1, MAS-2, MAS-3, MAS-4 ve MAS-5 kodları verilerek çalışmalara devam edilmiştir.

4.2 Antibiyogram

Yaygın şekilde kullanılan çeşitli klinik antibiyotiklere karşı bir suşun direnç özelliği taşınması ve bu direnç genlerini farklı mikroorganizmalara aktarmaması bu suşların probiyotik ve starter kültür olarak yararlanım potansiyeli için aranan bir özelliktir. *S.thermophilus* MAS suşlarının çeşitli ticari klinik antibiyotiklere karşı direnç özellikleri disk difüzyon metoduna göre saptanmıştır. Deney sonuçları CLSI (clinical and laboratory standards institute) 2012'ye göre inhibisyon zon çapı değerleri 20mm'den büyük olan laktik asit bakterileri kullanılan antibiyotiklere karşı duyarlı, 14-19mm arası orta seviyede dirençli ve 14mm'den küçük olanlar dirençli olarak değerlendirilmiştir. *S.thermophilus* MAS suşlarının CLSI standartlarına göre antibiyotik direnç verileri Çizelge 4.1'de, inhibisyon zon çapı sayısal değerleri ise EK. B' de verilmiştir.

Çizelge 4.1' e göre *S.thermophilus* MAS suşlarının antibiyotiklere olan dirençlilik ve hassasiyet özelliklerinin oransal değerleri şu şekildedir;

S.thermophilus MAS-1 suşu, Kloromfenikol (24.07mm), Penisilin (25.33mm) ve Trimethoprim (20.13mm) antibiyotiğine duyarlı, Ofloksasin (19.97mm) orta seviye dirençli, Amikasin, Kloksasilin, Basitrasin, Kanamisin, Nalidiksik asit ve Polimiksin B antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir.

S.thermophilus MAS-2 suşu, Kloromfenikol (29.79mm), ve Ofloksasin (21.21mm) antibiyotiğine duyarlı, Penisilin (16.02mm) orta seviye dirençli, Amikasin, Kloksasilin, Basitrasin, Kanamisin, Nalidiksik asit, Polimiksin B, Trimethoprim antibiyotiklerine dirençli olduğu tespit edilmiştir.

S.thermophilus MAS-3 suşu, Kloromfenikol (34.02mm) ve Ofloksasilin (25.74mm) duyarlı, Amikasin (15.66mm), Basitrasin (15.47mm), Penisilin (16.25mm) ve Trimethoprim (15.25mm) orta seviyeli dirençli, Kloksasilin, Kanamisin, Nalidiksik asit ve Polimiksin B antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir.

S.thermophilus MAS-4 suşu, Kloromfenikol (30.58mm), Ofloksasin (20.96mm) ve Penisilin (26.83mm) antibiyotiklerine duyarlı, Amikasin, Kloksasilin, Basitrasin, Kanamisin, Nalidiksik asit, Polimiksin B ve Trimethoprim antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir.

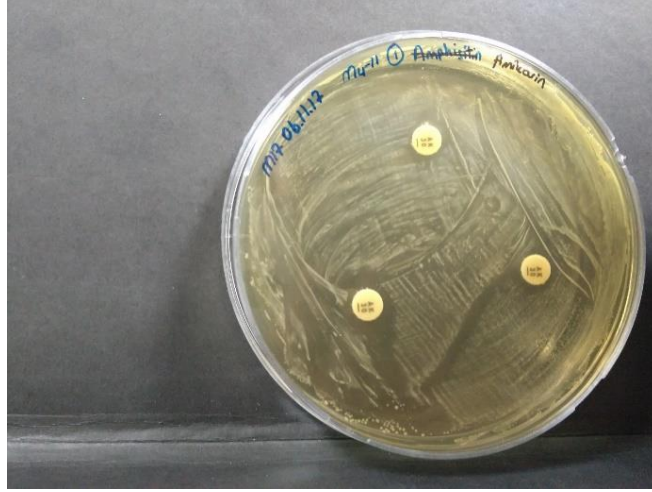
S.thermophilus MAS-5 suşu, Kloromfenikol (34.81mm) ve Ofloksasilin (24.02mm) antibiyotiklerine duyarlı, Amikasin (18.02mm), Basitrasin (14.17mm), Penisilin (15.29mm) ve Trimethoprim (16.30 mm) orta seviye dirençli olduğu, Kloksasilin, Kanamisin, Nalidiksik asit ve Polimiksin B antibiyotiklerine dirençli oldukları tespit edilmiştir.

S.thermophilus MAS-1 suşu Amikasin antibiyotik hassasiyeti Şekil 4.1. de, *S.thermophilus* MAS-2 suşu Polimiksin B antibiyotik hassasiyeti Şekil 4.2. de, *S.thermophilus* MAS-1 suşu Nalidiksik Asit antibiyotik hassasiyeti Şekil 4.3. de, *S.thermophilus* MAS-1 suşu Kloksasilin antibiyotik hassasiyeti Şekil 4.4. de verilmiştir.

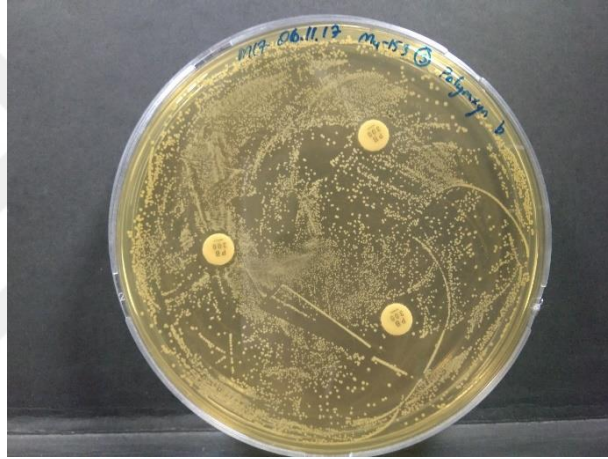
Çizelge 4.1. *S.thermophilus* MAS suşlarının antibiyotik hassasiyetleri (CLSI).

<i>S.thermophilus</i> suşları	AK	APX	B	C	K	NA	OFX	P	PB	SXT
MAS-1	R	R	R	S	R	R	IR	S	R	S
MAS-2	R	R	R	S	R	R	S	IR	R	R
MAS-3	IR	R	IR	S	R	R	S	IR	R	IR
MAS-4	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R
MAS-5	IR	R	IR	S	R	R	S	IR	R	IR

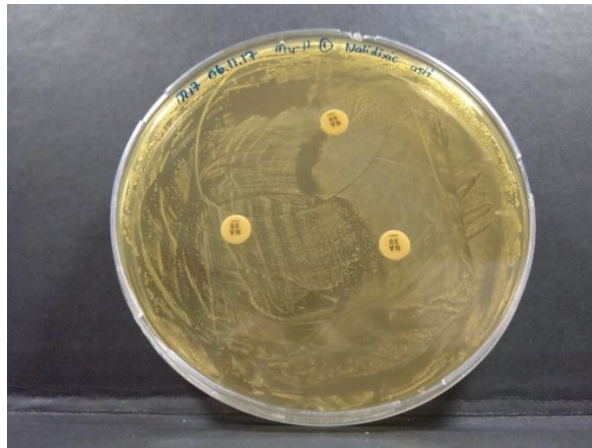
R:Dirençli , S:Hassas,Duyarlı IR:Orta Seviye Dirençli AK: Amikasin APX:Kloksasilin B:Basitrasin C:Kloromfenikol K:Kanamisin NA:Nalidiksik Asit OFX:Ofloksasin P:Penisilin PB:Polimiksin B SXT:Trimethoprim/Sulphamethoxazole



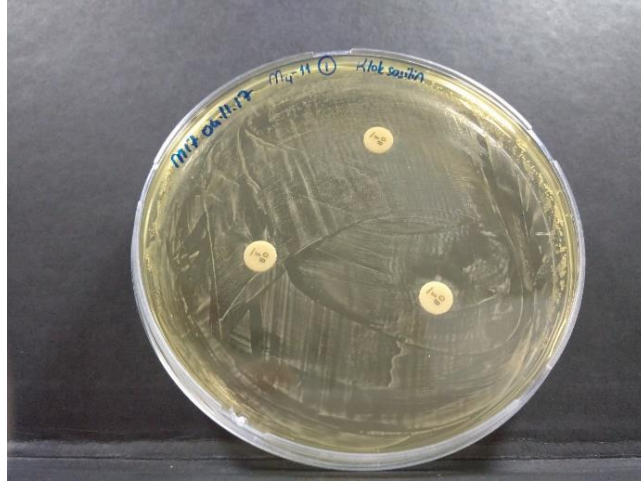
Şekil 4.1. *S.thermophilus* MAS-1 suşu amikasin antibiyotik hassasiyeti



Şekil 4.2. *S.thermophilus* MAS-2 suşu polimiksin b antibiyotik hassasiyeti.



Şekil 4.3. *S.thermophilus* MAS-1 suşu nalidiksik asit antibiyotik hassasiyeti.



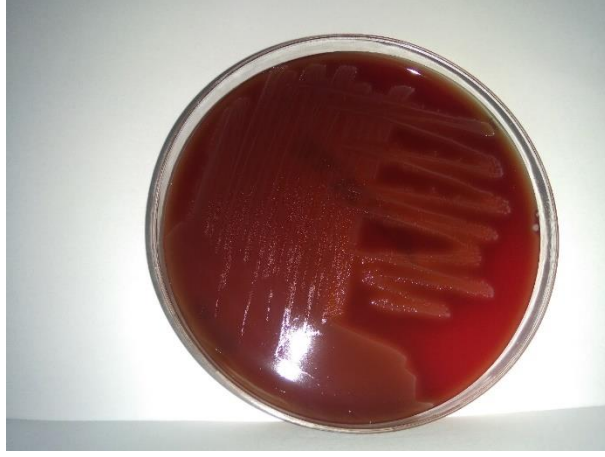
Şekil 4.4. *S.thermophilus* MAS-1 suşu kloksasilin antibiyotik hassasiyeti.

4.3 Hemolitik Aktivite

Tam hemoliz yapan (beta-hemolitik) bakterilerin insanda çoğunlukla enfeksiyona sebep oldukları bilinmektedir. Probiyotik olarak kullanılabilecek bakterilerin patojenik özellik taşıması ideal probiyotik seçiminde büyük önem arz etmektedir. *S.thermophilus* MAS suşlarının hemoliz enzim aktivitelerinin sonucu olarak MAS-1 ve MAS-3 suşlarının alfa hemolitik, MAS-2 MAS-4 ve MAS-5 suşlarının ise gama hemolitik aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir (Çizelge 4.2.). *S.thermophilus* MAS suşlarının hemolitik aktivite agar görüntüleri Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9 da verilmiştir.

Çizelge 4.2. *S.thermophilus* MAS suşlarının antibiyotik hassasiyetleri (CLSI).

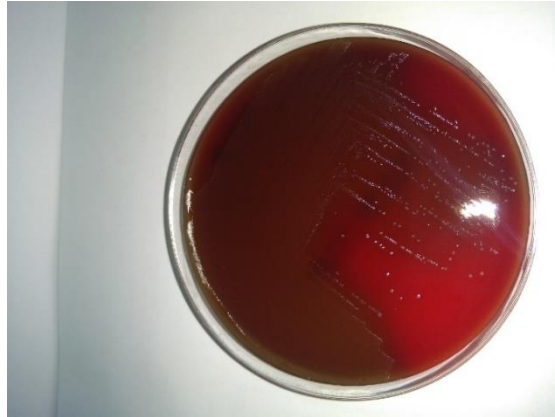
<i>S.thermophilus</i> suşları	Hemolitik aktivite
MAS-1	Alfa-Hemolitik
MAS-2	Gama-Hemolitik
MAS-3	Alfa -Hemolitik
MAS-4	Gama-Hemolitik
MAS-5	Gama -Hemolitik



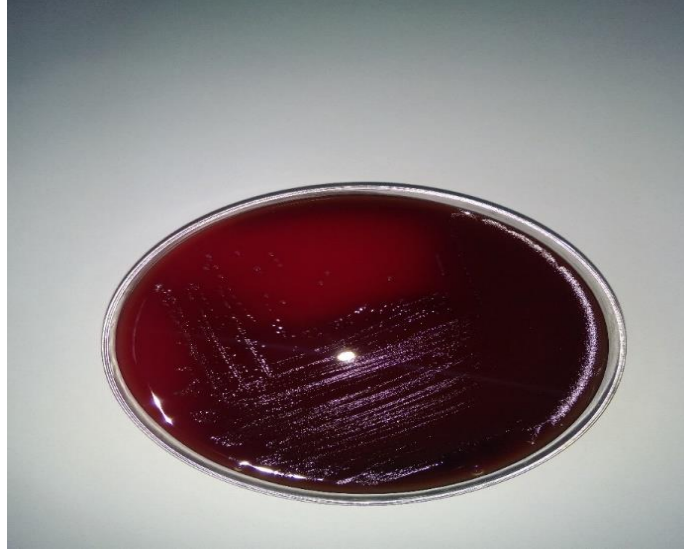
Şekil 4.5. *S.thermophilus* MAS-1 hemolitik aktivite sonuçları (alfa hemolitik).



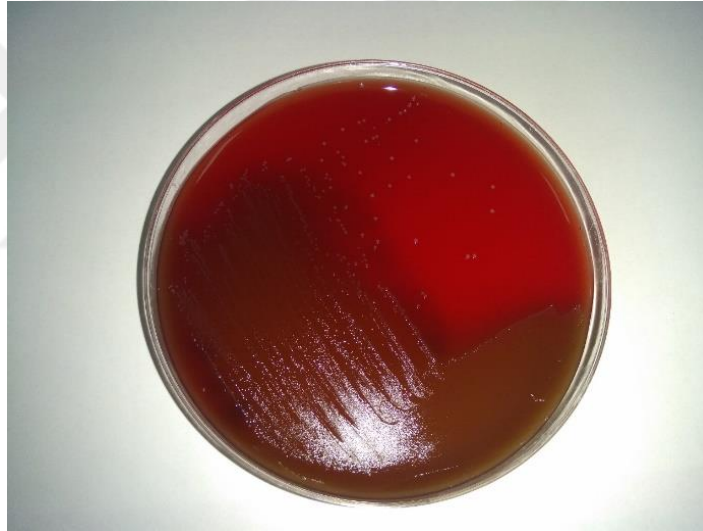
Şekil 4.6. *S.thermophilus* MAS-2 hemolitik aktivite sonuçları (gama hemolitik).



Şekil 4.7. *S.thermophilus* MAS-3 hemolitik aktivite sonuçları (alfa hemolitik).



Şekil 4.8. *S.thermophilus* MAS-4 hemolitik aktivite sonuçları (gama hemolitik)



Şekil 4.9. *S.thermophilus* MAS-5 hemolitik aktivite sonuçları (gama hemolitik).

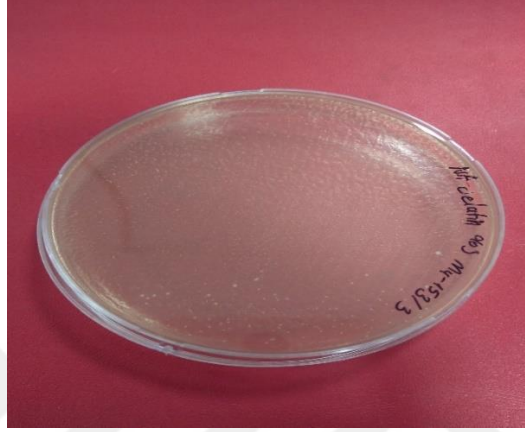
4.4 Jelatinaz Enzim Aktivitesi

S.thermophilus MAS suşlarının tamamının jelatinaz aktiviteye sahip olmadıkları tespit edilmiştir (Çizelge 4.3). Jelatinaz aktivite agar petri görüntüsü MAS-2 suşunun Şekil 4.10’da, MAS-5 suşunun görüntüsü ise Şekil 4.11’de verilmiştir.

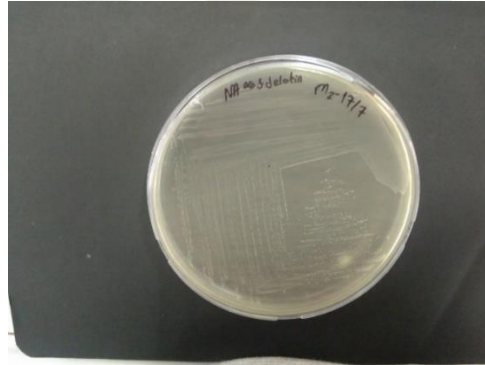
Çizelge 4.3. *S.thermophilus* MAS suşlarının jelatinaz aktiviteleri.

<i>S.thermophilus</i> suşları	Jelatinaz aktivite
MAS-1	-
MAS-2	-
MAS-3	-
MAS-4	-
MAS-5	-

(-): Jelatinaz Aktivite Yok



Şekil 4.10. *S.thermophilus* MAS-2 suşu jelatinaz aktivitesi.



Şekil 4.11. *S.thermophilus* MAS-5 suşu jelatinaz aktivitesi.

4.5 Asit Safra Toleransı

S.thermophilus MAS suşlarının aside dayanıklılık performansının değerlendirilmesi kapsamında denenen pH 2.0, ve pH 2.5 ortamında tüm suşlar için 0. ve 3. saatlerde seyreltme olmadan yapılan canlı sayımlarda üreme gözlemlenmemiştir. Denenen pH 3.0 koşullarında ise 0.saatlerde farklı dilüsyonlardan ekimleri gerçekleştirilen MAS-1 suşunda 7.60log Cfu/mL oranında ve MAS-2 suşunda 2 log Cfu/mL oranında canlı sayım gözlenmiştir. MAS-2 suşunun ise 0. Saatte yapılan ekimde canlılığının 2log

Cfu/mL'den 3logCfu/mL'ye artış gösterdiği, MAS-1, MAS-4, MAS-5 suşlarının canlılıklarını bir miktar azalarak büyük ölçüde korudukları gözlemlenmiştir. MAS suşlarının canlı sayım sonuçları Çizelge 4.4. de verilmiştir. Çizelge 4.5. de ise pH ve safra grupları için oluşturulan kontrol grubu canlı sayım sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.4. *S.thermophilus* MAS suşlarının pH 3.0 için canlı sayım sonuçları (log Cfu / mL).

<i>S.thermophilus</i> suşları	pH 3- 0. Saat log Cfu / mL	pH 3- 3.saat log Cfu / mL
MAS-1	7.60	3.91
MAS-2	2	3
MAS-3	-	-
MAS-4	7.02	4.74
MAS-5	7.24	4.77

(-): koloni gözlenmedi

Çizelge 4.5. *S.thermophilus* MAS suşlarının pH ve safra deney grupları için kontrol canlı sayım sonuçları(log Cfu /mL).

<i>S.thermophilus</i> suşları	Kontrol Grubu 0.saat log Cfu / mL	Kontrol Grubu 3.saat log Cfu / mL
MAS-1	10.26	13.62
MAS-2	9.87	12.18
MAS-3	6	12.86
MAS-4	9.53	12.53
MAS-5	9.57	13.20

Test edilen safra konsantrasyonlarından %0.3 safra ortamında 0. ve 3. saatlerde *S.thermophilus* MAS-1 8.897 log Cfu/mL'den 10.033 log Cfu/mL oranına kadar, MAS-2, MAS-3, MAS-4 ve MAS-5 suşlarının da benzer oranlarda artış göstererek canlılıklarını koruduğu ve safraya dirençli oldukları tespit edilmiştir. Diğer konsantrasyon olan %1 konsantrasyonunda tüm suşlarında canlılık oranlarında artış olduğu gözlenmiş fakat MAS-3 suşunda 0. saatte 7 log Cfu/mL iken 3. saatte 6.176 log Cfu/mL oranına düşüş yaptığı gözlenmiştir.

Denenen tüm konsantrasyonlar için canlı sayım sonuçları Çizelge 4.6. da yer almaktadır. *S.thermophilus* MAS suşlarının pH 2.0 spektrofotometrik değerleri Çizelge 4.7’de, *S.thermophilus* MAS suşlarının pH 2.5 spektrofotometrik değerleri Çizelge 4.8’de, *S.thermophilus* MAS suşlarının pH 3.0 spektrofotometrik değerleri Çizelge 4.9’da, *S.thermophilus* MAS suşlarının %0.3 safra spektrofotometrik değerleri Çizelge 4.10’da, *S.thermophilus* MAS suşlarının %1 safra spektrofotometrik değerleri Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.6. *S.thermophilus* MAS suşlarının farklı safra konsantrasyonları canlı sayım sonuçları (log Cfu/mL.)

<i>S.thermophilus</i> suşları	%0.3 Safra 0. Saat log Cfu/mL	%0.3 Safra 3. Saat log Cfu/mL	%1 Safra 0. Saat log Cfu/mL	%1 Safra 3. Saat log Cfu/mL
MAS-1	8.897	10.033	9.478	10.079
MAS-2	8.826	9.940	9.041	10.021
MAS-3	6.20	10.204	7	6.176
MAS-4	8.698	9.636	9.133	10.283
MAS-5	8.643	9.759	9.204	9.955

Çizelge 4.7. *S.thermophilus* MAS suşlarının pH 2.0 spektrofotometrik değerleri.

<i>S.thermophilus</i> suşları	0.saat pH 2.0	3.saat pH 2.0
MAS-1	0.02± 0.00	0.03± 0.00
MAS-2	0.04±0.00	0.03±0.00
MAS-3	0.03±0.00	0.03±0.00
MAS-4	0.05±0.00	0.04±0.00
MAS-5	0.05±0.00	0.04±0.00

Çizelge 4.8. *S.thermophilus* MAS suşlarının pH 2.5 spektrofotometrik değerleri.

<i>S.thermophilus</i> suşları	0.saat pH 2.5	3.saat pH 2.5
MAS-1	0.03± 0.00	0.03± 0.00
MAS-2	0.04±0.00	0.03±0.00
MAS-3	0.04±0.00	0.04±0.00
MAS-4	0.04±0.00	0.04±0.00
MAS-5	0.04±0.00	0.04±0.00

Çizelge 4.9. *S.thermophilus* MAS suşlarının pH 3.0 spektrofotometrik değerleri.

<i>S.thermophilus</i> suşları	0.saat pH 3.0	3.saat pH 3.0
MAS-1	0.02± 0.00	0.02± 0.00
MAS-2	0.03±0.00	0.03±0.00
MAS-3	0.03±0.00	0.03±0.00
MAS-4	0.04±0.00	0.04±0.01
MAS-5	0.04±0.01	0.04±0.00

Çizelge 4.10. *S.thermophilus* MAS suşlarının %0.3 safra spektrofotometrik değerleri

<i>S.thermophilus</i> suşları	0.saat %0.3 safra	3.saat %0.3 safra
MAS-1	0.06± 0.00	1.23± 0.00
MAS-2	0.06±0.00	1.46±0.00
MAS-3	0.04±0.00	1.12±0.00
MAS-4	0.08±0.00	1.44±0.01
MAS-5	0.06±0.00	1.45±0.01

Çizelge 4.11. *S.thermophilus* MAS suşlarının %1 safra spektrofotometrik değerleri.

<i>S.thermophilus</i> suşları	0.saat %1 safra	3.saat %1 safra
MAS-1	0.06± 0.00	1.29± 0.00
MAS-2	0.06±0.00	1.42±0.01
MAS-3	0.05±0.00	0.05±0.00
MAS-4	0.06±0.00	1.38±0.01
MAS-5	0.05±0.00	1.38±0.01

4.6. Antimikrobiyal Aktivite

Çalışmada *S.thermophilus* MAS suşlarının süpernatantları çeşitli insan-gıda patojenleri, balık patojenleri ve *Candida* türlerine karşı antimikrobiyal aktiviteleri kuyu difüzyon metodu ile belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre on altı adet gıda-insan patojenine *S.thermophilus* MAS suşlarının hiçbirinin antimikrobiyal aktivite göstermediği tespit edilmiştir (Çizelge 4.12.).

Çizelge 4.12. *S.thermophilus* MAS suşlarının gıda-insan patojenleri üzerine antimikrobiyal aktiviteleri.

Test Mikroorganizmaları	MAS-1	MAS-2	MAS-3	MAS-4	MAS-5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	-	-	-	-	-
<i>Bacillus megaterium</i> (Pasteur Ens.5117)	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i> RSKK 171	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> RSKK 863	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> RSKK 244	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> NRRL B-4375	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	-	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i> MU:57	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 11175	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 11228	-	-	-	-	-

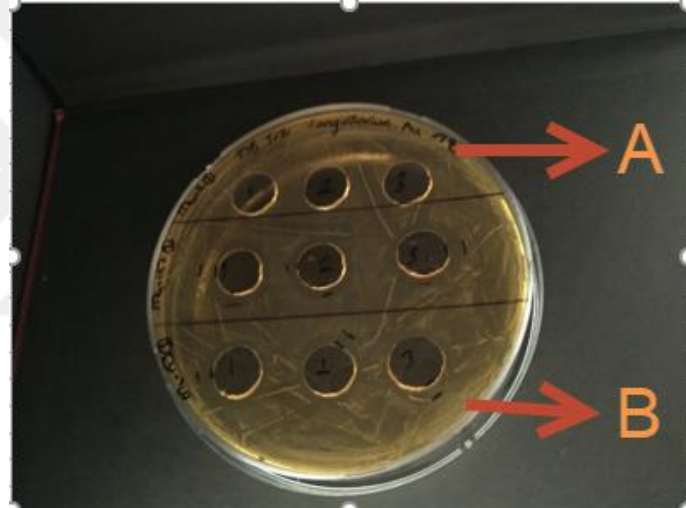
(-) :İnhibisyon zonu yok (dirençli)

S.thermophilus MAS-1, MAS-4, MAS-5 suşlarının uygulanan balık patojenlerinin tamamında antimikrobiyal aktivite göstermediği tespit edilmiştir. MAS-2 suşunun *V.anguillarum* M1 patojenine karşı göstermiş olduğu antimikrobiyal aktivite zon çapı değeri 1.88mm, *V.anguillarum* A4 (Şekil 4.12.b) patojenine karşı göstermiş olduğu antimikrobiyal aktivite zon çapı değeri 3.34mm ve MAS-3 suşunun *V.anguillarum* M1 patojenine karşı göstermiş olduğu antimikrobiyal aktivite zon çapı değeri 2.07mm, *V.anguillarum* A4 patojenine karşı göstermiş olduğu antimikrobiyal aktivite zon çapı değeri 2.36mm olarak kaydedilmiştir. MAS-2 ve MAS-3 suşlarının balık patojenlerinden *L.garvieae*, *V.alginolyticus*, *Y.ruckeri*, *A.hydrophila*, *S.agalactiae* üzerinde hiçbir antimikrobiyal etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.13. de MAS suşlarının balık patojenleri üzerine antimikrobiyal aktivite sonuçları yer almaktadır. MAS-1 suşu *V.anguillarum* A4 antifungal aktivite petri görüntüsü Şekil 4.12.a’da verilmiştir.

Çizelge 4.13. *S.thermophilus* MAS suşlarının balık patojenleri üzerine antimikrobiyal aktiviteleri.

Test Mikroorganizmaları	MAS-1	MAS-2	MAS-3	MAS-4	MAS-5
<i>V.anguillarum</i> M1	-	1.88±0.43	2.07±0.3	-	-
<i>V.anguillarum</i> A4	-	3.34±0.29	2.36±0.33	-	-
<i>L.garvieae</i>	-	-	-	-	-
<i>V.alginolyticus</i>	-	-	-	-	-
<i>Y.ruckeri</i>	-	-	-	-	-
<i>A.hydrophila</i>	-	-	-	-	-
<i>S.agalactiae</i>	-	-	-	-	-

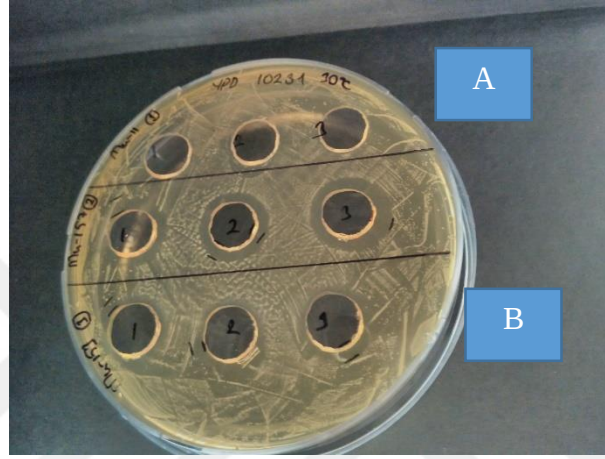


Şekil 4.12. a) *S.thermophilus* MAS-1 *V.anguillarum* A4 b) *S.thermophilus* MAS-2 *V.anguillarum* A4 antifungal aktivitesi.

Antifungal aktivitenin belirlenmesi doğrultusunda *S.thermophilus* MAS-1 (Şekil.4.13.a), MAS-4, MAS-5’in *C.albicans* ATCC 10231 ve *C.glabrata* üzerinde antifungal etki göstermediği, MAS-3 suşunun *C.glabrata* üzerinde antifungal etki göstermediği, MAS-2 suşunun *C.albicans* ATCC 10231 (Şekil4.13.b) patojenine karşı göstermiş olduğu inhibisyon zon değeri 2.62mm ve *C.glabrata* RSKK 04019 üzerinde 2.78mm inhibisyon zon değeri kaydedilerek antifungal etki gösterdiği ve MAS-3 suşunun *C.albicans* ATCC 10231 üzerinde 2.87mm inhibisyon zon değeri ile antifungal etki gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.14. *S.thermophilus* MAS suşlarının mayalar üzerine antimikrobiyal aktiviteleri.

Test Mikroorganizmaları	MAS-1	MAS-2	MAS-3	MAS-4	MAS-5
<i>C.albicans</i> ATCC 10231	-	2.62±0.26	2.87±0.46	-	-
<i>C.glabrata</i> RSKK 04019	-	2.78± 0.34	-	-	-



Şekil 4.13. a) *S.thermophilus* MAS-1 *C.albicans* ATCC 10231 b) *S.thermophilus* MAS-2 *C.albicans* ATCC 10231

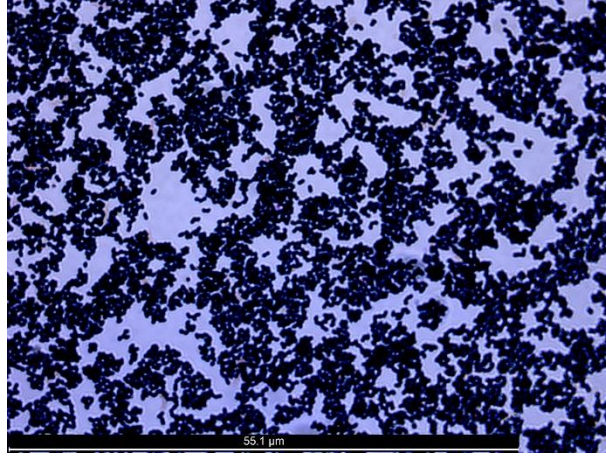
4.7 Agregasyon Özellikleri

4.7.1 Otoagregasyon

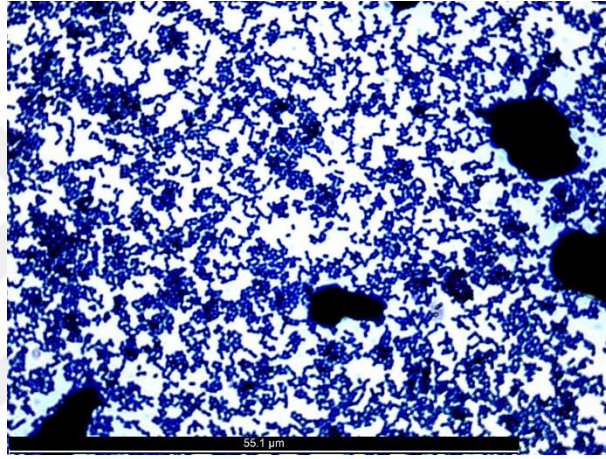
S.thermophilus MAS-2 (Şekil4.15.) ve MAS-3 (Şekil4.16.) suşlarının %99 oranı ile en yüksek otoagregasyon özelliği gösteren suşlar olduğu tespit edilmiştir. Bunları takiben en yüksek oranlar %98 ile MAS-1 (Şekil4.14), %97 ile MAS-4 ve %95 ile MAS-5 suşlarının olduğu tespit edilmiştir (Çizelge4.15.).

Çizelge 4.15. *S.thermophilus* MAS Suşlarının % otoagregasyon değerleri.

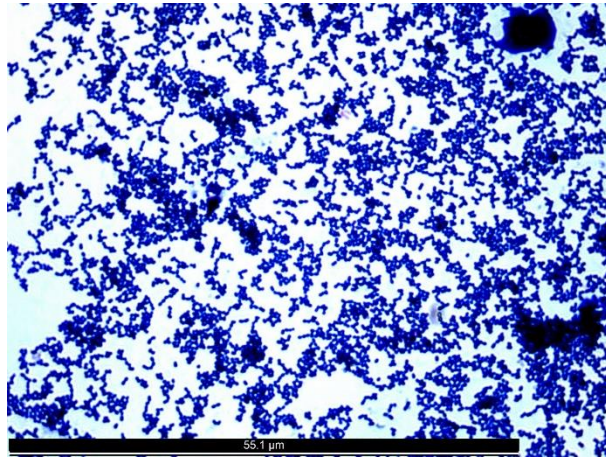
<i>S.thermophilus</i> suşları	% Otoagregasyon
MAS-1	98
MAS-2	99
MAS-3	99
MAS-4	97
MAS-5	95



Şekil 4.14. *S.thermophilus* MAS-1 otoagregasyon mikroskop görüntüsü.



Şekil 4.15. *S.thermophilus* MAS-2 otoagregasyon mikroskop görüntüsü.



Şekil 4.16. *S.thermophilus* MAS-3 otoagregasyon mikroskop görüntüsü.

4.7.2 Koagregasyon

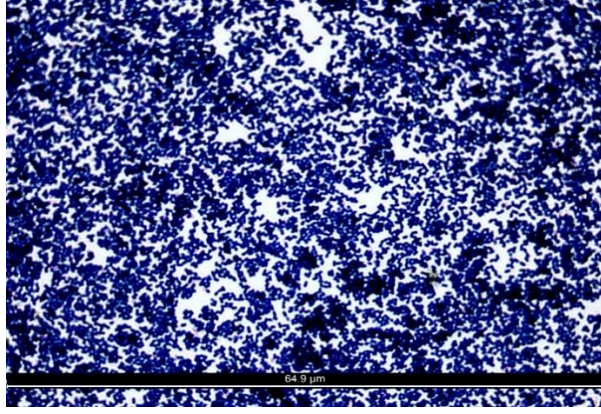
Koagregasyon yeteneği yararlı mikroorganizmaların mide bağırsak geçidinde canlı kalarak ve epitel hücrelere yapışarak burada kolonize olup aynı zamanda patojen mikroorganizmalara yapışarak ve onların gelişimini inhibe ederek yarar sağlaması açısından büyük önem taşır.

S.thermophilus MAS suşlarının tamamının balık patojenleri ile koagregasyon gösterdiği ve bu oranın %54 ile %61 oranında değıştiği tespit edilmiştir. MAS-1 suşunun *A.hydrophila*, *S.agalactiae*, *V.alginolyticus*, *L.garvieae*, *Y.ruckeri* ile %60, *V.anguillarum* M1, *V.anguillarum* A4 ile %59 oranında koagregasyon yeteneği gösterdiği tespit edilmiştir. MAS-2 suşunun *A.hydrophila*, *V.alginolyticus*, *L.garvieae*, *Y.ruckeri* ile %60, *S.agalactiae*, *V.anguillarum* M1, *V.anguillarum* A4 (Şekil 4.19) ile %59 oranında koagregasyon yeteneği gösterdiği tespit edilmiştir. MAS-3 suşunun, *S.agalactiae* ve *V.anguillarum* M1 ile %59, *L.garvieae* (Şekil4.17) ile %61, *A.hydrophila*, *V.alginolyticus*, *V.anguillarum* A4 (Şekil4.18), *Y.ruckeri* ile %60 oranında koagregasyon yeteneği gösterdiği tespit edilmiştir. MAS-4 suşunun *A.hydrophila* ile %54, *V.anguillarum* M1 ile %57, *S.agalactiae* ve *Y.ruckeri* ile %58, *V.alginolyticus*, *V.anguillarum* A4 ve *L.garvieae* ile %59 oranında koagregasyon yeteneği gösterdiği tespit edilmiştir.

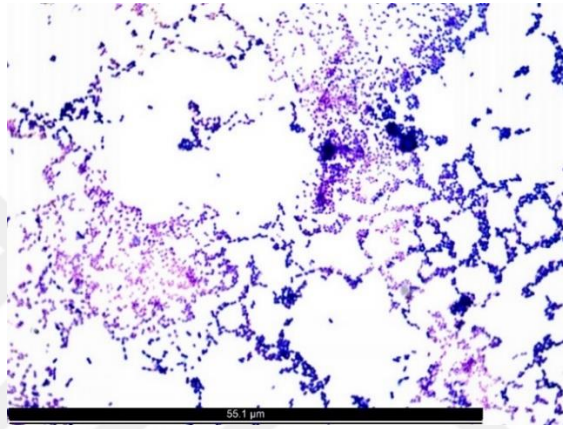
MAS-5 suşunun *A.hydrophila* ile %54, *V.anguillarum* M1 ile %56, *S.agalactiae* ile %58, *V.alginolyticus*, *V.anguillarum* A4, *L.garvieae*, *Y.ruckeri* (şekil 4.20) ile %59 oranında koagregasyon yeteneği gösterdiği tespit edilmiştir. (Çizelge 4.16.)

Çizelge 4.16. *S.thermophilus* MAS suşlarının çeşitli balık patojenleri ile % koagregasyon yetenekleri

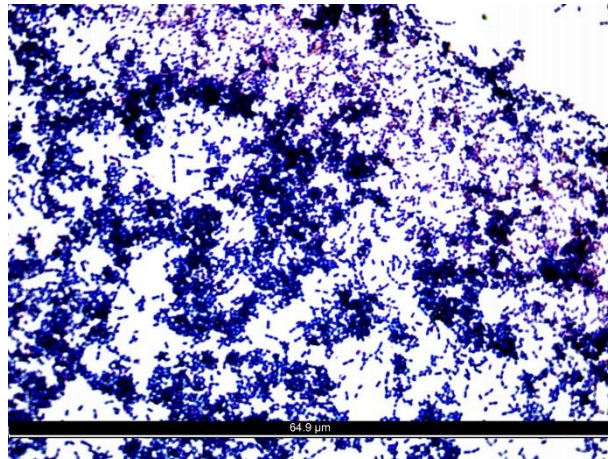
Test Mikroorganizmaları	MAS-1	MAS-2	MAS-3	MAS-4	MAS-5
<i>A.hydrophila</i>	60	60	60	54	54
<i>S.agalactiae</i>	60	59	59	58	58
<i>V.alginolyticus</i>	60	60	60	59	59
<i>V.anguillarum</i> M1	59	59	59	57	56
<i>V.anguillarum</i> A4	59	59	60	59	59
<i>L.garvieae</i>	60	60	61	59	59
<i>Y.ruckeri</i>	60	60	60	58	59



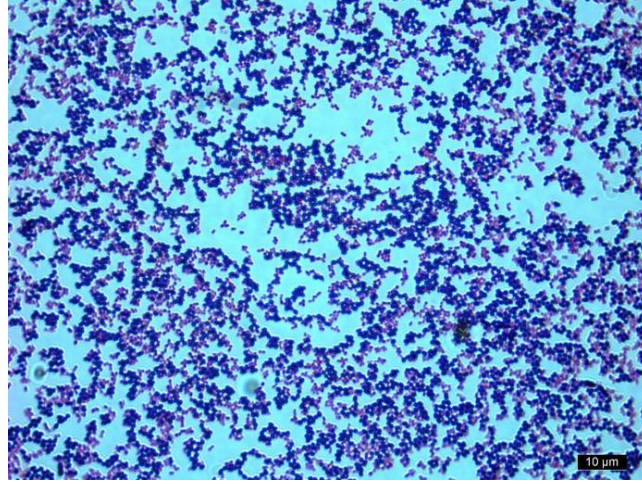
Şekil 4.17. *S.thermophilus* MAS-3 *L.garvieae* koagregasyon mikroskop görüntüsü.



Şekil 4.18. *S.thermophilus* MAS-3 *V.anguillarum* A4 koagregasyon mikroskop görüntüsü.



Şekil 4.19. *S.thermophilus* MAS-2 *V.anguillarum* A4 koagregasyon mikroskop görüntüsü.

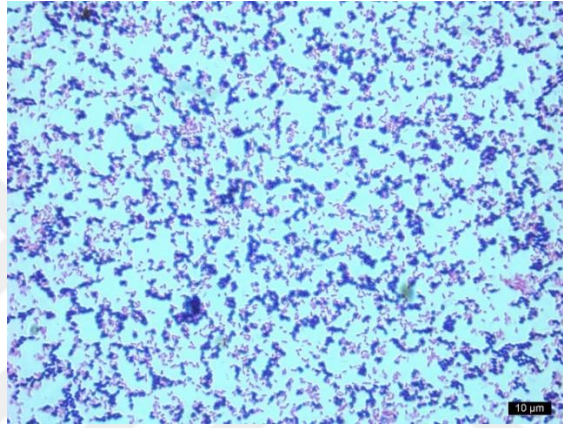


Şekil 4.20. *S.thermophilus* MAS-5 *Y.ruckeri* koagregasyon mikroskop görüntüsü.

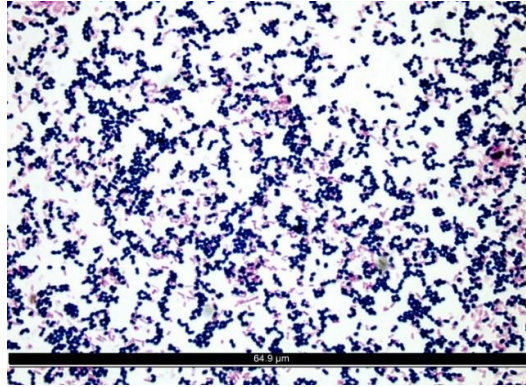
S.thermophilus MAS suşlarının tamamının test edilen yedi adet gıda-insan patojeni ile gösterdikleri koagregasyon yetenekleri en düşük %55, en yüksek %60 oranında olduğu kaydedilmiştir. *B.cereus* RSKK 863 MAS-1 ile %58, MAS-2-MAS-3-MAS-4 ile %56, MAS-5 ile %60 oranında koagregasyon göstermiştir. *B.megaterium* 5117 için MAS-1-MAS-4 ile %59, MAS-3-MAS-5 %58, MAS-2 %60 oranları, *B.subtilis* RSKK 244 için MAS-1-MAS-4-MAS-5 %59, MAS-2-MAS-3 %60, *Y.enterocolitica* ATCC 11175 için MAS-1 %58, MAS-2 %56, MAS-3-MAS-4 %55, MAS-5 %59, *S.sonei* MU:57 için MAS-1 %57, MAS-2 %60, MAS-3 %60, MAS-4 %59, MAS-5 %58, *S.aureus* ATCC 25923 için MAS-1-MAS-2-MAS-3 %59, MAS-4 %58, MAS-5 %60, *P.aeruginosa* ATCC 27853 için MAS-1 %58, MAS-2-MAS-3-MAS-4 %60, MAS-5 %59 oranları koagregasyon değerleri olarak kaydedilmiştir (Çizelge 4.17). Mikroskop görüntüleri ise Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23 ve Şekil 4.24’de verilmiştir.

Çizelge 4.17. *S.thermophilus* MAS suşlarının gıda-insan patojenleri ile % koagregasyon yetenekleri.

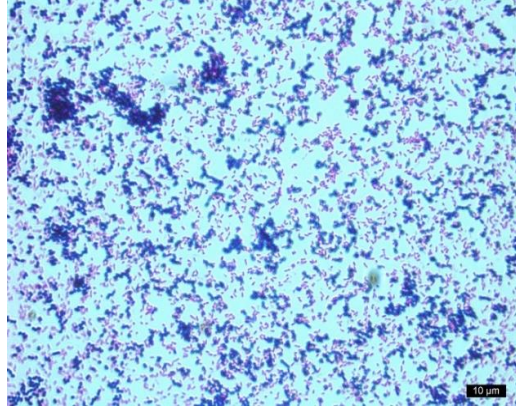
Test Mikroorganizmaları	MAS-1	MAS-2	MAS-3	MAS-4	MAS-5
<i>B.cereus</i> RSKK 863	58	56	56	56	60
<i>B.megaterium</i> 5117	59	60	58	59	58
<i>B.subtilis</i> RSKK 244	59	60	60	59	59
<i>Y.enterolitica</i> ATCC 11175	58	56	55	55	59
<i>Shigella sonei</i> MU:57	57	60	60	59	58
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	59	59	59	58	60
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	58	60	60	60	59



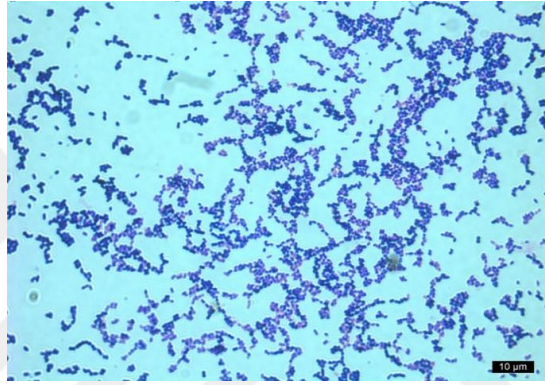
Şekil 4.21. *S.thermophilus* MAS-4 *P.aeruginosa* ATCC 27853 koagregasyon mikroskop görüntüsü.



Şekil 4.22. *S.thermophilus* MAS-5 *Shigella sonei* MU:57 koagregasyon mikroskop görüntüsü.



Şekil 4.23. *S.thermophilus* MAS-3 *P.aeruginosa* ATCC 27853 koagregasyon mikroskop görüntüsü



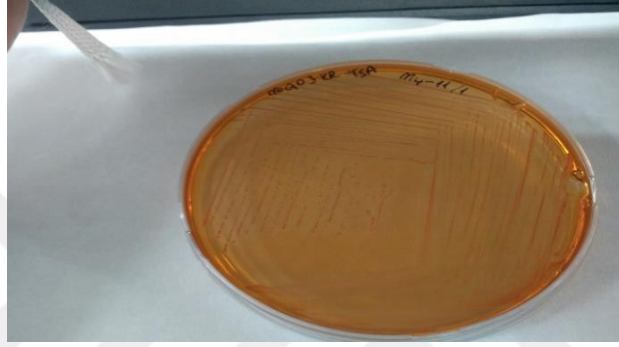
Şekil 4.24. *S.thermophilus* MAS-2 *Y.enterocolitica* ATCC 11175 koagregasyon mikroskop görüntüsü.

4.8 Hidrofobisite

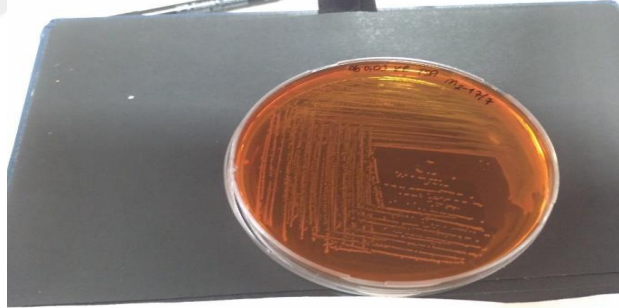
Suşların probiyotik olarak değerlendirilmesinde bir kriter olan epitel yüzeylere tutunmasında agregasyon özelliği ile birlikte hidrofobisite özelliğinin de olması gerekmektedir. Hidrofobik özellik, bakterilerin epitele tutunma kabiliyetinde olduğunu göstermektedir. *S.thermophilus* MAS suşlarının hidrofobisite özelliklerinin belirlenmesi doğrultusunda tüm suşların hidrofobik özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.18). MAS-1 hidrofobisite görüntüsü Şekil 4.24’de, MAS-5 ise Şekil 4.26’da verilmiştir.

Çizelge 4.18. *S.thermophilus* MAS suşlarının hidrofobisite özellikleri.

<i>S.thermophilus</i> suşları	Hidrofobisite
MAS-1	+
MAS-2	+
MAS-3	+
MAS-4	+
MAS-5	+



Şekil 4.25. *S.thermophilus* MAS-1 hidrofobisite görüntüsü.



Şekil 4.26. *S.thermophilus* MAS-5 hidrofobisite görüntüsü.

4.9 Nisin Dirençliliği

Yapılan çalışma sonucunda *S. thermophilus* MAS suşlarının tamamının test edilen dokuz değişik nisin konsantrasyonuna (1.25, 2.5, 5, 10, 20, 25, 50, 100 ve 150 µg/ml) dirençli olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.19). *S. thermophilus* MAS-1 nisin dirençliliği Şekil 4.27’de, *S. thermophilus* MAS-2 nisin dirençliliği Şekil 4.28’de, *S. thermophilus* MAS-5 nisin dirençliliği Şekil 4.29’da verilmiştir.

Çizelge 4.19. *S.thermophilus* MAS suşlarının nisin dirençliliği.

<i>S.thermophilus</i> suşları	Nisin Konsantrasyonları (µg/ml)								
	1.25	2.5	5	10	20	25	50	100	150
MAS-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAS-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAS-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAS-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAS-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-



Şekil 4.27. *S. thermophilus* MAS-1 nisin dirençliliği



Şekil 4.28. *S. thermophilus* MAS-2 nisin dirençliliği



Şekil 4.29. *S. thermophilus* MAS-5 nisin dirençliliği

4.10 Antioksidan Aktivite

Çalışmada elde edilen verilere göre *S.thermophilus* MAS suşlarının DPPH radikalini indirgeme aktiviteleri %29.84-36.90 değerleri arasında kaydedilmiştir. Tüm *S.thermophilus* MAS suşlarının arasında en yüksek antioksidan aktivite %36.90 değeri ile MAS-4 suşu, en düşük aktivite ise %29.84 değeri ile MAS-1 suşu için kaydedilmiştir.

S.thermophilus MAS suşlarının demir iyonu şelatlama aktiviteleri ise %23.44-30.13 değer aralığında kaydedilmiştir. Tüm *S.thermophilus* MAS suşlarının arasında en yüksek antioksidan aktivite %30.13 değeri ile MAS-4 suşu için, en düşük aktivite ise %23.44 değeri ile MAS-1 suşu için kaydedilmiştir (Çizelge4.20.).

Çizelge 4.20. *S.thermophilus* MAS suşlarının antioksidan aktiviteleri.

<i>S. thermophilus</i> suşları	% DPPH radikalini indirgeme	% Demir iyonu Şelatlama
MAS-1	29.84	23.44
MAS-2	36.06	28.55
MAS-3	35.36	27.56
MAS-4	36.90	30.13
MAS-5	32.35	24.44

4.11 Sodyum Benzoat Dirençliliği

S.thermophilus MAS suşlarının sodyum benzoat gıda katkı maddesine direnç özellikleri spektrofotometrik ve canlı hücre sayımı ile belirlenmiştir. Bu amaçla %0.015 ile %1 aralığında on farklı sodyum benzoat konsantrasyonuna sahip besiyerine ekimi yapılan MAS suşlarının OD değerleri spektrofotometrik olarak belirlenmiş ve bu değerler Çizelge 4.21’de verilmiştir. Wibbertmann vd., (2000), sodyum benzoatın pH 4.5 ve altında aktif olduğunu bildirmiştir. Bu nedenle deneyde pH 4.5 değerine ayarlanan gruplarda kullanılmıştır. Bu grupların spektrofotometrik ölçüm, asit üretme ve canlı sayımları sırasıyla Çizelge 4.24., Çizelge 4.25. ve Çizelge 4.26. de verilmiştir.

Bunun yanı sıra spektrofotometrik ölçüm yapılan her grubun pH değerleri de kaydedilmiş ve bu değerler Çizelge 4.23’de verilmiştir.

%0.1 sodyum benzoat konsantrasyonu için koloni sayımı sonuçlarının (Çizelge 4.22) logaritmik verileri 8.50-9.47 değer aralığında olduğu tespit edilmiştir.%0.1 sodyum benzoatlı ortamda MAS-3 suşunun canlılığını arttırdığı tespit edilmiştir.

PH 4.5 değerinde yapılan seyreltme yapılmaksızın uygulanan ekim sonrası yapılan canlı sayım logaritmik değerleri MAS-1, MAS-4, MAS-5 (5.27-5.06-5.20) Log Cfu/mL olarak kaydedilmiştir.

Çizelge 4.21. *S.thermophilus* MAS suşlarının sodyum benzoat direnç özellikleri (spektrofotometrik).

<i>S.thermophilus</i> suşları	MAS-1	MAS-2	MAS-3	MAS-4	MAS-5
Kontrol Grubu	1.43±0.00	1.61±0.00	1.58±0.01	1.66±0.01	1.61±0.00
0.015 mg/mL	1.50±0.11	1.63±0.02	1.56±0.01	1.67±0.00	1.62±0.01
0.025 mg/ mL	1.43±0.00	1.63±0.01	1.71±0.43	1.66±0.00	1.60±0.02
0.075 mg/ mL	1.42±0.07	1.61±0.01	1.48±0.01	1.58±0.00	1.59±0.04
0.1mg/ mL	1.43±0.03	1.64±0.01	1.52±0.01	1.53±0.08	1.62±0.00
0.2 mg/ mL	1.43±0.02	1.63±0.01	1.41±0.02	1.50±0.03	1.62±0.00
0.3 mg/ mL	1.43±0.00	1.61±0.00	1.34±0.02	1.33±0.03	1.60±0.01
0.4 mg/ mL	1.42±0.01	1.60±0.01	1.27±0.02	1.19±0.02	1.54±0.04
0.5 mg/ mL	1.38±0.01	1.59±0.01	1.14±0.00	1.14±0.01	1.59±0.00
1 mg/ mL	1.33±0.01	1.54±0.02	0.97±0.01	1.05±0.09	1.56±0.02

Çizelge 4.22. *S.thermophilus* MAS suşlarının 0.1 mg/mL sodyum benzoata direnç özellikleri (Log Cfu/mL)

<i>S. thermophilus</i> suşları	Canlı Hücre Değerleri	
	Kontrol Grubu Log Cfu/mL	0.1 mg/mL sodyum benzoat Log Cfu/mL
MAS- 1	9.81	9.24
MAS- 2	9.35	9.47
MAS- 3	7.79	8.50
MAS- 4	8.82	8.81
MAS- 5	9.63	9.25

Çizelge 4.23. *S.thermophilus* MAS suşlarının sodyum benzoatlı ortamda asit üretme yetenekleri.

% Sodyum benzoat (mg/mL)	Başlangıç pH	MAS-1	MAS-2	MAS-3	MAS-4	MAS-5
0.015	7.6	5.8	6.0	5.8	5.6	6.0
0.025	7.6	5.9	6.0	5.8	5.7	6.0
0.050	7.6	5.9	6.0	5.7	5.6	5.9
0.075	7.7	5.7	5.9	5.8	5.6	6.0
0.1	7.6	5.7	6.0	5.8	5.7	6.0
0.2	7.6	5.8	6.0	5.8	5.6	5.4
0.3	7.7	5.9	5.8	5.6	5.7	6.0
0.4	7.6	5.8	6.0	5.8	5.7	5.9
0.5	7.6	6.0	6.2	5.9	5.7	5.9
1	7.6	6.2	6.2	6.2	5.9	6.1

Çizelge 4.24. *S.thermophilus* MAS suşlarının sodyum benzoat direnç özellikleri (spektrofotometrik pH4.5).

<i>S. thermophilus</i> suşları	MAS-1	MAS-2	MAS-3	MAS-4	MAS-5
Kontrol Grubu	0.21±0.09	0.05±0.06	0.05±0.00	0.29±0.01	0.31±0.03
0.015 mg/mL	0.15±0.01	0.01±0.00	0.00±0.00	0.25±0.00	0.16±0.01
0.025 mg/mL	0.02±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.16±0.00	0.17±0.00
0.050 mg/mL	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00
0.075 mg/mL	0.01±0.00	0.00±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.02±0.01
0.1 mg/mL	0.01±0.00	0.00±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
0.2 mg/mL	0.01±0.00	0.02±0.00	0.01±0.00	0.01±0.01	0.01±0.00
0.3 mg/mL	0.01±0.00	0.01±0.01	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
0.4 mg/mL	0.02±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.02±0.01	0.02±0.00
0.5 mg/mL	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
1 mg/mL	0.01±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00

Çizelge 4.25. *S.thermophilus* MAS suşlarının sodyum benzoatlı ortamda asit üretme yetenekleri (pH4.5).

% Sodyum benzoat (mg/mL)	Başlangıç pH	MAS-1	MAS-2	MAS-3	MAS-4	MAS-5
0.015	4.3	4.6	4.7	4.7	4.6	4.6
0.025	4.6	4.7	4.6	4.6	4.6	4.6
0.050	4.5	4.5	4.5	4.5	4.6	4.5
0.075	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6
0.1	4.7	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6
0.2	4.5	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6
0.3	4.5	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6
0.4	4.4	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6
0.5	4.6	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7
1	4.6	4.7	4.7	4.6	4.6	4.7

Çizelge 4.26. *S.thermophilus* MAS suşlarının 0.1 mg/mL sodyum benzoata direnç özellikleri (Log Cfu/mL pH4.5).

<i>S. thermophilus</i> suşları	Canlı Hücre Değerleri	
	Kontrol Grubu Log Cfu/mL	0.1 mg/mL sodyum benzoat Log Cfu/mL
MAS-1	9.96	5.27
MAS-2	8.89	-
MAS-3	-	-
MAS-4	9.53	5.06
MAS-5	9.68	5.20

-:Koloni gözlenmedi

4.12 Amilaz, Likenaz, Proteaz, Selülaz Enzim Aktiviteleri

Enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar doğrultusunda MAS suşlarının hepsinin amilaz negatif, likenaz pozitif, proteaz negatif olduğu ve MAS-3 suşunun ise selülaz negatif, MAS-1, MAS-2, MAS-4 ile MAS-5 suşlarının selülaz pozitif olduğu belirlenmiştir (Çizelge4.27.).

MAS-1, MAS-2, MAS-3 suşlarının amilaz enzim aktivite görüntüsü Şekil 4.30’da, likenaz Şekil 4.32’de, proteaz Şekil 4.34’de, selülaz Şekil 4.36’da verilmiştir. MAS-4 ve MAS-5 suşlarının amilaz enzim aktivite görüntüsü Şekil4.31’ de, likenaz Şekil 4.33’de, proteaz Şekil 4.35’de, selülaz Şekil 4.37’da verilmiştir.

Çizelge 4.27. *S.thermophilus* MAS suşlarının enzim aktiviteleri

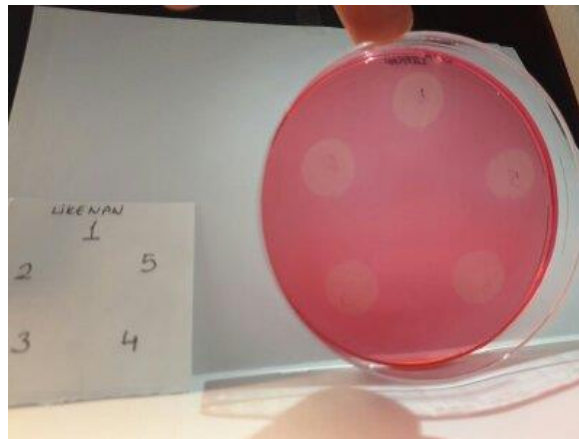
<i>S. thermophilus</i> suşları	Amilaz	Likenaz	Proteaz %7 Skimmilk	Proteaz %10 Skimmilk	Selülaz
MAS-1	-	+	-	-	+
MAS-2	-	+	-	-	+
MAS-3	-	+	-	-	-
MAS-4	-	+	-	-	+
MAS-5	-	+	-	-	+



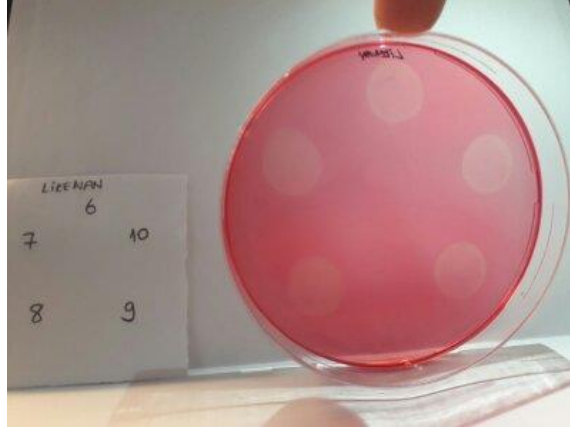
Şekil 4.30. *S.thermophilus* MAS-1, MAS-2 ve MAS-3 amilaz enzim aktivite görüntüsü.



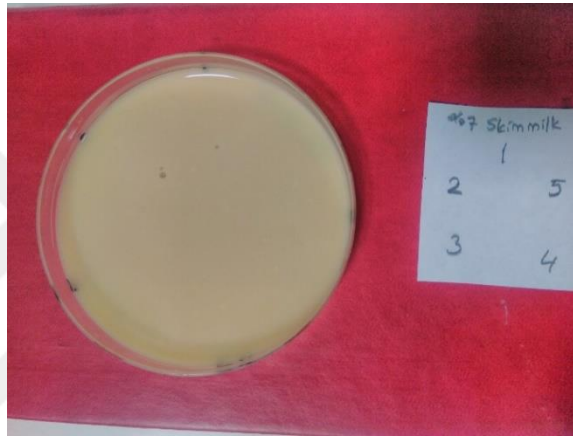
Şekil 4.31. *S.thermophilus* MAS-4 ve MAS-5 amilaz enzim aktivite görüntüsü.



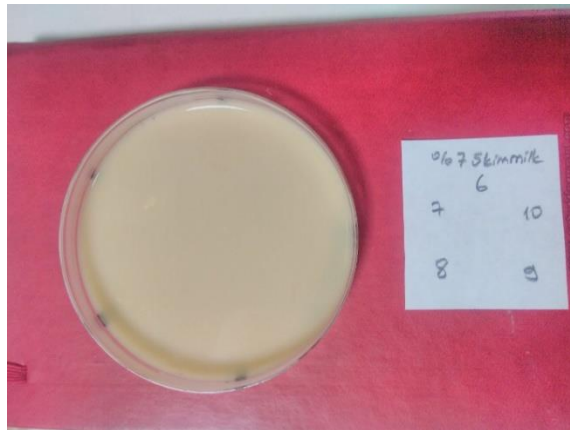
Şekil 4.32. *S.thermophilus* MAS-1, MAS-2 ve MAS-3 likenaz enzim aktivite görüntüsü



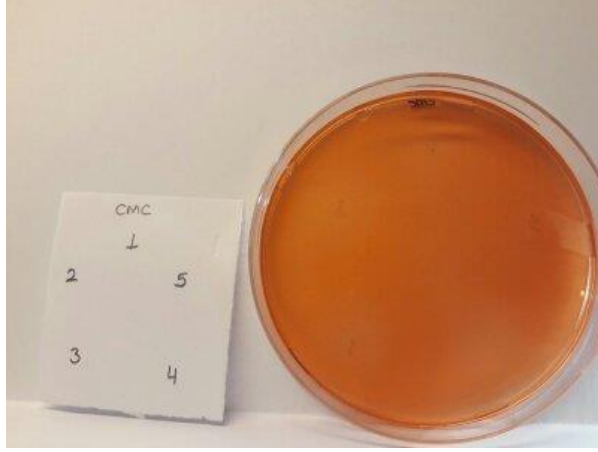
Şekil 4.33. *S. thermophilus* MAS-4 ve MAS-5 likenaz enzim aktivite görüntüsü.



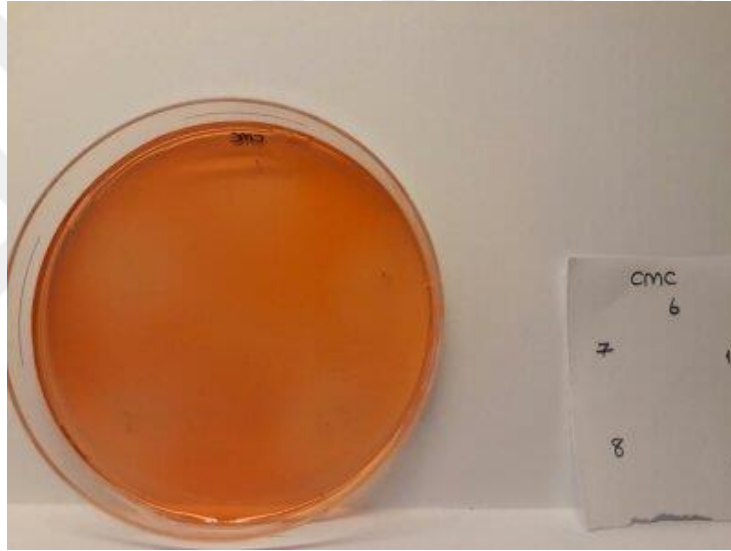
Şekil 4.34. *S. thermophilus* MAS-1, MAS-2 ve MAS-3 proteaz enzim aktivite görüntüsü.



Şekil 4.35. *S. thermophilus* MAS-4 ve MAS-5 proteaz enzim aktivite görüntüsü.



Şekil 4.36. *S.thermophilus* MAS-1, MAS-2 ve MAS-3 selülag enzim aktivite görüntüsü.



Şekil 4.37. *S.thermophilus* MAS-4 ve MAS-5 selülag enzim aktivite görüntüsü.

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Çalışma kapsamında, daha önce yapılan bir proje kapsamında anne sütünden izole edilen laktik asit bakterileri, PCR tabanlı moleküler tanımlama yöntemi ile genetik olarak tanımlanmıştır. Moleküler olarak karakterize edilen farklı anne sütlerinden beş adet *S.thermophilus* MAS (MAS-1, MAS-2, MAS-3, MAS-4 ve MAS-5), suşunun probiyotik ve starter kültür olarak kullanımlarında güvenilirliklerini belirlemek için antibiyotik direnci, hemolitik ve jelatinaz enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Teknolojik çalışmalarda kullanım potansiyellerini belirlemek için düşük pH (2.0, 2.5, 3.0) toleransı, safra toleransı, agregasyon koagregasyon yetenekleri test edilmiştir. Ayrıca nisin, sodyum benzoat gibi gıda katkılarına toleransları belirlenmiştir. Bunun yanı sıra MAS suşlarının antimikrobiyal, antioksidan aktiviteleri, amilaz, likenaz, selüloz, proteaz enzim aktiviteleri, hidrofobisite ve hemolitik aktivite özellikleri araştırılmıştır.

S.thermophilus MAS suşlarının probiyotik özelliklerinin belirlenmesi çalışmalarında, suşların tamamının Kloksasilin, Nalidiksik Asit ve Polimiksin B antibiyotiklerine karşı direnç, Kloromfenikol antibiyotiğine karşı hassasiyet gösterdiği belirlenmiştir. MAS suşlarının klinik antibiyotiklere karşı direnç göstermesi, suşlardan probiyotik kültür olarak yararlanım potansiyelini arttırmaktadır.

Probiyotik bir kültür olarak karakterize edilen bir şusun gama hemolitik aktiviteye sahip olması, suşun biyoproseslerde kullanımının güvenilirliği açısından önemli bir in vitro seçim kriteridir. Hemolitik aktivitenin olmaması suşların probiyotik ve starter kültür olarak kullanımlarında güvenilir olduklarını göstermektedir. Bu bilgiler doğrultusunda MAS-1 ve MAS-3 alfa hemolitik, MAS-2, MAS-4, MAS-5 gama hemolitik olarak tespit edilmiştir.

Jelatinaz aktivitesi, jelatin başta olmak üzere kollojen, kazein, hemoglobin, insülin ve bazı diğer biyoaktif peptitleri hidrolize edebilir (Lopes ve ark., 2006). Bu da canlılar açısından istenmeyen bir durumdur. Bu nedenle *S.thermophilus* MAS suşlarının tamamının jelatinaz aktiviteye sahip olmadıkları ve probiyotik, starter kültür olarak kullanımları açısından güvenilir oldukları tespit edilmiştir.

Probiyotik olarak karakterize edilecek suşun gastrointestinal sistemde safrayı tolere etme, bağırsak sistemine ulaşabilmesi ve burada tutunarak kolonize olup etki gösterebilmesi açısından büyük bir gerekliliktir (Azcarate-Peril vd., 2008). Bu bağlamla uygulanan asitlik ve safra toleranslarına MAS suşlarının direnç seviyeleri test edilmiştir. *S.thermophilus* MAS suşlarının aside dayanıklılık performansının pH 2 ve 2.5 değerinde canlı sayımlarda koloni oluşumu gözlemlenmemiştir. Ancak pH 3 değerinde 0. saatlerde MAS-3 suşu dışındaki tüm suşlarda canlılık tespit edilmiş, 3. saatte ise canlı kalan suşların azalarak da olsa büyük oranda canlılıklarını sürdürdüğü belirlenmiştir. Denenen safra konsantrasyonlarından tümünde MAS suşları canlılıklarını artırarak koruduğu ancak MAS-3 suşunda %1 safra konsantrasyonunda 0. Saatte 7 Cfu/mL iken 3. Saatte 6.176 Cfu/mL ya düştüğü ancak yine de yüksek oranda canlılığını koruduğu gözlemlenmiştir. Genel olarak safranin gelişimi desteklediği kaydedilmiştir.

Laktik asit bakterilerinin bir çok enterik patojenin gelişimini inhibe etmede ve hem insanlar hem de hayvanlarda görülen gastrointestinal sistem bozuklukları tedavisinde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Fernandez vd., 2003). Bu nedenle probiyotik kültür olarak tanımlanacak olan bir suşun gelişip yayılma gösterdiği bir habitatta çeşitli antimikrobiyal maddeler salgılayarak, patojen mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmesi beklenmektedir. MAS suşlarının *E. coli* ATCC 11229, *E. coli* O157:H7, *B. megaterium* (Pasteur Ens.5117), *S. enteritidis* RSKK 171, *B. cereus* RSKK 863, *B.subtilis* RSKK 244, *E. coli* ATCC 35218, *M. luteus* NRRL B-4375, *S.enteritidis* ATCC 13076, *S. sonnei* MU:57, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Y. enterocolitica* ATCC 11175, *E. faecalis* ATCC 29212, *L.monocytogenes* ATCC 7644, *S. epidermidis* ATCC 11228 patojenlerine antimikrobiyal aktivite göstermediği saptanmıştır. MAS-2 ve MAS-3 suşları balık patojenlerinden *V.anguillarum* M1 ve *V.anguillarum* A4 üzerinde 1.88mm ile 3.34mm aralığında antimikrobiyal etki göstermiştir. Mayalar üzerinde ise MAS-3 suşu yalnız *C.albicans* ATCC 10231 2.87mm, MAS-2 ise *C.albicans* ATCC 10231 2.62mm, *C.glabrata* da ise 2.78mm etki gösterdiği tespit edilmiştir.

MAS suşlarının otoagregasyon yetenekleri %95 ila %99 değerleri arasında kaydedilmiştir. MAS suşları balık patojenleriyle koagregasyonunda en düşük %54, en

yüksek %61 değeri, MAS suşları gıda-insan patojenleriyle koagregasyonunda ise en düşük %55, en yüksek %60 değeri kaydedilmiştir. Otoagregasyon yeteneğinin yüksek olması mikroorganizmaların bağırsaklarda kolonize olarak güçlü bir bariyer oluşturması ve bu sayede patojen mikroorganizmaların bu alanlarda kolonize olmalarını önlemeleri açısından oldukça önemlidir.

Bakteriyosinlerden olan nisin, konserve gıdalar, süt ürünleri, peynir, süt ve bebek mamasına ilave edilmektedir. 50'den fazla ülkede 0.25-37.50mg/L (veya mg/kg) konsantrasyonları arasında doğal bir gıda koruyucu olarak kullanılmaktadır. Tüm suşların test edilen dokuz değişik nisin konsantrasyonuna (1.25, 2.5, 5, 10, 20, 25, 50, 100 ve 150µg/mL) dirençli olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışma sonucunda, *S.thermophilus* MAS suşlarının nisinle birlikte gıda katkıları olarak gıda sanayinde kullanılabileceğini göstermiştir.

Serbest radikallerin ve reaktif oksijenin seviyesinin artarak besinlerde birikmesi sonucunda gıda bozulmaları meydana gelmektedir. Antioksidan özellik taşıyan maddelerin ROS ve serbest radikalleri indirgemesi ve zararlı etkilerini azaltması veya yok etmesi oldukça kritik bir durumdur. Son yıllardaki çalışmalarda bitki kökenli bileşenlerin antioksidan özellikleri daha çok çalışılsa da çeşitli fonksiyonel özellikleri taşıyan laktik asit bakterilerinin kendilerini yenileme süresinin kısa olması, metabolik aktivitelerinin hızlı olması ve kolay elde edilebilirliği bir avantaj oluşturmaktadır. *S.thermophilus* MAS suşlarının DPPH radikalini süpürme aktiviteleri %29.84-36.90, demir iyonu şelatlama aktiviteleri ise %23.44-30.13 değer aralığında kaydedilmiştir. Tüm MAS suşlarının arasında en yüksek antioksidan aktivite her iki metot ile de MAS-4 suşu için, en düşük aktivite ise MAS-1 suşu için kaydedilmiştir.

Sodyum benzoat gıda sanayiinde koruyucu olarak kullanılan yapay bir gıda katkı maddesidir (Chen vd., 2009). Bu nedenle sodyum benzoat kimyasal katkı maddesinin gıda içeriğinde doğal olarak bulunan veya sonradan eklenen probiyotik mikroorganizmalar üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

%0.1 sodyum benzoat konsantrasyonu için koloni sayımı sonuçlarının logaritmik verileri 8.50-9.47 Cfu/mL değer aralığında olduğu tespit edilmiştir. Sodyum benzoatın MAS-3 suşunun gelişimini teşvik ettiği belirlenmiştir.

Mikroorganizma kökenli enzimler, gıda, tekstil, deterjan, kağıt, alkollü içki üretimi gibi sanayinin birçok alanında da kullanılmaktadır. Mikrobiyal enzimler arasında amilaz, karboksimetil selüloz, β -(1,3-1,4)-glukanaz (likenaz) ve proteaz endüstriyel enzimler olup gıda ve içecek üretimi gibi çeşitli endüstrilerde kullanılmaktadır. Literatürde, *Streptococcus* spp.'den amilaz, karboksimetil selüloz, likenaz ve proteaz enzimlerinin üretimi üzerine çalışmalar oldukça sınırlıdır. Enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar doğrultusunda MAS suşlarının hepsinin amilaz negatif, likenaz pozitif, proteaz negatif olduğu ve MAS-3 suşunun ise selüloz negatif, MAS-1, MAS-2, MAS-4 ile MAS-5 suşlarının selüloz pozitif olduğu belirlenmiştir.

Hidrofobisite probiyotik özelliklerin belirlenmesi amacıyla önemli bir seçim kriteridir. Hidrofobisitenin kazandırdığı en önemli özellik mikroorganizmaların epitel hücrelere tutunmasını sağlamasıdır. Potansiyel probiyotik suşların bağırsak epitel hücrelerine yapışma yeteneğinin olması önemli bir özelliktir. Probiyotik bakterilerin intestinal sistemde patojenlere karşı bariyer oluşturarak epitele yapışmasını engellediği düşünülmektedir. *S.thermophilus* MAS suşlarının hidrofobisite özelliklerinin belirlenmesi doğrultusunda tüm suşların hidrofobik özelliğe sahip olduğu, intestinal mukozal hücrelere tutunma özelliğinde olduğu belirlenmiştir. Hidrofobisiteye sahip olan suşların probiyotik nitelik ortaya koyması açısından deney sonuçları olumlu netice vermiştir.

S. thermophilus MAS suşlarının nispeten safra ve asite dirençlilikleri, antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri, antibiyotik hassasiyetleri, hemolitik ve jelatinaz aktivitelerinin olmaması nedeniyle güvenilir olmaları, agregasyon ve koagregasyon yeteneklerinin yanında epitel hücrelerine tutunmasını sağlayan hidrofobisite özelliğine sahip olup probiyotik nitelik taşımaları, gıda katkısı nisin ve sodyum benzoata ile birlikte kullanıldıklarında canlılıklarını yitirmemeleri ve sanayinin değişik alanlarında kullanılan çeşitli enzimleri üretebilmeleri nedenleri ile *S.thermophilus* MAS suşları daha ileri çalışmalar yapıldıktan sonra çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilme potansiyeli taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Abubakr, M.A., Hassan, Z. ve Imdakim, M.M.A., 2012. Antioxidant activity of lactic acid bacteria (LAB) fermented skim milk as determined by 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and ferrous chelating activity (FCA), African Journal of Microbiology Research, 6,34, 6358-6364.
- Asmahan A.A., 2011. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Drinking Yoghurt in Khartoum State, Sudan Current Research in Bacteriology 4,16-22.
- Axelsson, L., 1998. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects, Eds. Salminen, S., Wright, A., Marcel Decker, Inc. New York, Bassel, Hong Kong, 1-72.
- Azcarate-Peril, M.A., Altermann, E., Goh, Y.J., Tallon, R., Sanozky-Dawes, R.B., Pfeiler, E.A. ve Miller, M.J., 2008. Analysis of the genome sequence of *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 reveals the molecular basis of an autochthonous intestinal organism, Applied and environmental microbiology, 74,15, 4610-4625.
- Brigidi P., Swemen E., Vitali B., Rossi M., Matteuzzi D., 2003. PCR Detection of Bifidobacterium Strains and Streptococcus thermophilus in feces on human subjects after oral bacteriotherapy and yogurt consumption. International Journal of Microbiology, 81, 203-209.
- Campana, R., Federici, S., Ciandrini, E. ve Baffone, W., 2012. Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 on the growth and adhesion/invasion characteristics of human *Campylobacter jejuni*, Current microbiology, 64,4, 371-378.
- Chaves, A.C.S.D., Fernandez, M., Lerayer, A.L.S., Mierau, I., Kleerebezem, M. ve Hugenholtz, J., 2002. Metabolic Engineering of Acetaldehyde Production by *Streptococcus thermophilus*, Appl. Environ. Microbiol, 5656-5662.
- Chen, H, Hoover, D.G., 2003. Bacteriosins and their food applications. Comprehensive Reviews, In Food Science and Food Safety, 2, 82-100.
- Chen, Q., Huang, N.N., Huang, J.T., Chen, S., Fan, J., Li, C. ve Xie, F.K., 2009. Sodium benzoate exposure downregulates the expression of tyrosine hydroxylase and dopamine transporter in dopaminergic neurons in developing zebrafish, Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology, 86,2, 85- 91.
- Claridge, S., 2006. Mother's Milk: Precious Protection, Original Article, <https://www.womenshealthcouncil.org.nz/Womens+Health+Issues/Breastfeeding/Mothers+Milk+precious+protection.html> Erişim Tarihi : 9.4.19.

- CLSI, 2014. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement M100-S24, CLSI, Wayne, PA, USA.
- Correa, N.B.O., Luciano, A., Filho, P., Francisco, J., Penna, F., Lima, M.L.S., ve Nicolı, J.R., 2005. A Randomized Formula Controlled Trial of Bifidobacterium Lactis And Streptococcus Thermophilus For Prevention of Antibiotic-Associated Diarrhea İn Infants, Alimentary Tract Clinical Research.
- Çakır, İ., 2003. Laktobasillus ve bifidobakterlerde bazı probiyotik özelliklerin belirlenmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- De Vuyst, L., Tsakalidou, E., 2008. Streptococcus macedonicus, a multi-functional and promising species for dairy fermentations. Int. Dairy J. 18, 476-485.
- Elli, M., Callegari M.L., Ferrari S., Bessi E., Cattivelli D., Soldi S., Morelli L., Feuillerat N.G., ve Antoine J.M., 2006. Survival of Yogurt Bacteria in the Human Gut. American Society for Microbiology, 5113-5117.
- Eryılmaz, T.F., 2011. Vajinal sekresyondan izole edilen laktik asit bakterilerine ait bazı suşların potansiyel probiyotik özelliklerin belirlenmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
- Etöz, D., 2006. Kefirden izole edilen maya ve bakterilerin bazı patojen mikroorganizmalar üzerine inhibitör etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R. ve Rodríguez, J.M., 2013. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease, Pharmacological Research, 69,1, 1-10.
- Fernandez, M.F., Boris, S., ve Barbes, C., 2003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract, Journal of Applied Microbiology, 94,3, 449-455.
- Gilliand, S.E., 1990. Health and Nutritional Benefits from Lactic acid bacteria, FEMS Microbiology Reviews, 87, 175-188.
- Gümüştekin, Y., 2010. Bazı *Lactobacillus* cinsi bakterilerin sodyum benzoat'a karşı dirençliliklerinin belirlenmesi ve bazı probiyotik özelliklerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Gürsoy, O. ve Kınık, O., 2005. Laktobasiller ve probiyotik peynir üretiminde kullanım potansiyelleri, Mühendislik Bilimleri Dergisi, 3, 361-371.
- Hanson, L., Korothova, M., 2002. The Role of Breastfeeding in Prevention of Neonatal Infection, Semin Neonatol, 7, 275-281.

- Harrigan, W. F. ve M.E. McCance, 1990. Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press, London.
- Hugas, M., 1998. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. Meat Science, 49, Suppl.1.
- James R., Kleanthous C., Moore G.R., 1996. The biology of E colicins: paradigms and paradoxes, Microbiology, 142, 1569.
- Kılıç, S., 2001. Süt endüstrisinde laktik asit bakterileri. ege üniversitesi ziraat fakültesi yayınları, No: 542, 451, İzmir.
- Kıran F., Osmanağlu O., 2011. Laktik asit bakterilerinin identifikasyonunda/ tiplendirmesinde kullanılan moleküler yöntemler. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 27,1, 62-74.
- Klaenhammer, R.T., Kullen, J.M., 1999. Selection and design of properties, Int. J. Food Microbiol., 50, 45-57.
- Klaenhammer, Y.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria, Biochimie., 70, 337-349.
- 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.
- Lick S, Drescher K, Heller K, 2001. Survival of Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus and Streptococcus thermophilus in the Terminal Ileum of Fistulated Göttingen Minipigs. American Society for Microbiology.
- Lopes, M.F.S., Simoes, A.P., Tenreiro, R., Marques, J.J.F., Crespo, M.T.B., 2006. Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. International Journal of Food Microbiology, 112, 208–214.
- 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.
- Mater, D.D.G., Bretigny, L., Firmesse, O., Flores, M.J., Mogenet, A., Bresson, J.L., Corthier, G., 2005. Streptococcus Thermophilus And Lactobacillus Delbrueckii Subsp. Bulgaricus Survive Gastrointestinal Transit of Healthy Volunteers Consuming Yoğurt, FEMS Microbiology Letters 250.
- Mishra, V., Shah, C., Mokashe, N., Chavan, R., Yadav, H. ve Prajapati, J., 2015. Probiotics as potential antioxidants: a systematic review, Journal of agricultural and food chemistry, 63,14, 3615-3626.

- Ouwehand, A.C., Isolauri, E., Kirjavainen, P.V. ve Salminen, S.J., 2000. The mucus binding of *Bifidobacterium lactis* Bb12 is enhanced in the presence of *Lactobacillus* GG and *Lact. delbrueckii subsp. bulgaricus*, Letters in Applied Microbiology, 30,1, 10-13.
- Iyer R, Tomar S.K, Kapila, S., Mani, J., Singh, R., 2010. Probiotic Properties of Folate Producing Streptococcus Thermophilus Strains, Food Research International 43.
- Rezzukoğlu, İ., 2011. Laktik asit bakterisinden α -amilaz izolasyonu ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır.
- Sharma K.K., Soni S.S., 2006. Meharchandani S. Congo red dye agar test as an indicator test for detection of invasive bovine Escherichia coli. Veterinarski Arhiv 76,363–366.
- Sharma, P., Tomar, S.K., Sangwan, V., Goswami, P. ve Singh, R., 2016. Antibiotic resistance of *Lactobacillus* sp. isolated from commercial probiotic preparations, Journal of Food Safety, 36,1, 38-51.
- Schaafsma, G., Siezen, R.J., Kok, J., Abee, T., 2002. Lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications - Proceedings of the Seventh Symposium on Lactic Acid Bacteria: genetics, metabolism and applications, 1-5 September 2002, Egmond aan Zee, the Netherlands. Anton Leeuw Int J G 82, 1-1.
- Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Hold, J.G., 1986. Bergey's Manuel of Sistematic Bacteriology, 2, 1208-1234.
- Soler-Rivas, C., Espín, J.C. ve Wichers, H.J., 2000. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs, Phytochemical Analysis, 11,5, 330-338.
- Soto, A., Martín, V., Jiménez, E., Mader, I., Rodríguez, J. M. ve Fernández, L., 2014. Lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk: influence of antibiotherapy and other host and clinical factors, Journal of pediatric gastroenterology and nutrition, 59,1, 78.
- Tokatlı, M., 2013. Ankara Çubuk yöresi turşularından izole edilen laktik asit bakterilerinin tanımlanmaları, teknolojik ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi ve starter olarak kullanılma olanaklarının değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Tomás, J., Wiese, B., ve Nader-Macías, M.E., 2005. Effects of culture conditions on the growth and auto-aggregation ability of vaginal *Lactobacillus johnsonii* CRL 1294, Journal of applied microbiology, 99,6, 1383-1391.

- 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.
- Vural, T., 1998. Probiyotikler, XXVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Özet Kitabı. 33-34.
- Weaver, L.T., 2003. Prentice A. Nutrition in infancy, In: Morgan JB, Dickerson WT, editors, *Nutrition in Early Life*. London: Wiley, 20-32.
- Wibbertmann, A., Kielhorn, J., Koennecker, G., Mangelsdorf, I., and Melber, C., 2000. Fraunhofer Institute for Toxicology and Aerosol Research, Hanover, Germany, Concise International Chemical Assessment Document 26, WHO Geneva.
- Zoral, S., 2013. İnsan kaynaklı *Lactobacillus* spp suşlarının probiyotik özelliklerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ahi Evran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Kırşehir.

EKLER

EK .A. *S.thermophilus* MAS suşlarının PCR ile moleküler olarak identifikasyonu

EK. B. *S.thermophilus* MAS suşlarının antibiyotik hassiyetleri



EK .A. *S.thermophilus* MAS suşlarının PCR ile moleküler olarak identifikasyonu

EK.A.1. *S.thermophilus* MAS-1 suşunun PCR ile elde edilen (16 S RNA forward transkripsiyon) sekans dizileri.

File: 1-515F_C02.ab1

Geospiza
www.geospiza.com

Sample Name: 1-515F

Signal Strengths: A = 54, C = 48, G = 65, T = 74

Mobility: KB_3130_POP4_BDTv3.mob

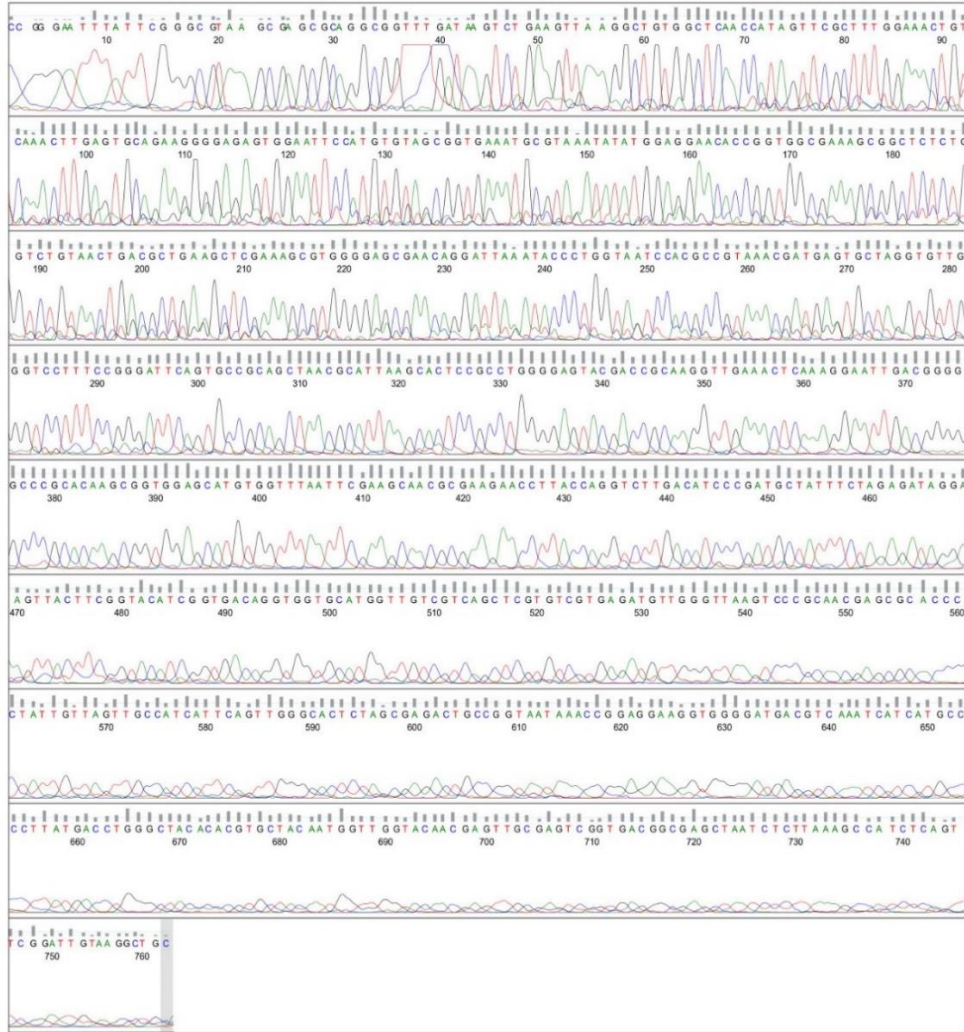
Lane/Cap#: 10

Spacing: 15.298

Matrix: n/a

Comment: n/a

Direction: Native



Printed: Tem 11, 2017 6:22PM

FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

EK.A.4. *S.thermophilus* MAS-4 suşunun PCR ile elde edilen (16 S RNA forward transkripsiyon) sekans dizileri.

File: 6-515F_H02.ab1

Geospiza
www.geospiza.com

Sample Name: 6-515F

Signal Strengths: A = 49, C = 44, G = 58, T = 68

Mobility: KB_3130_POP4_BDTv3.mob

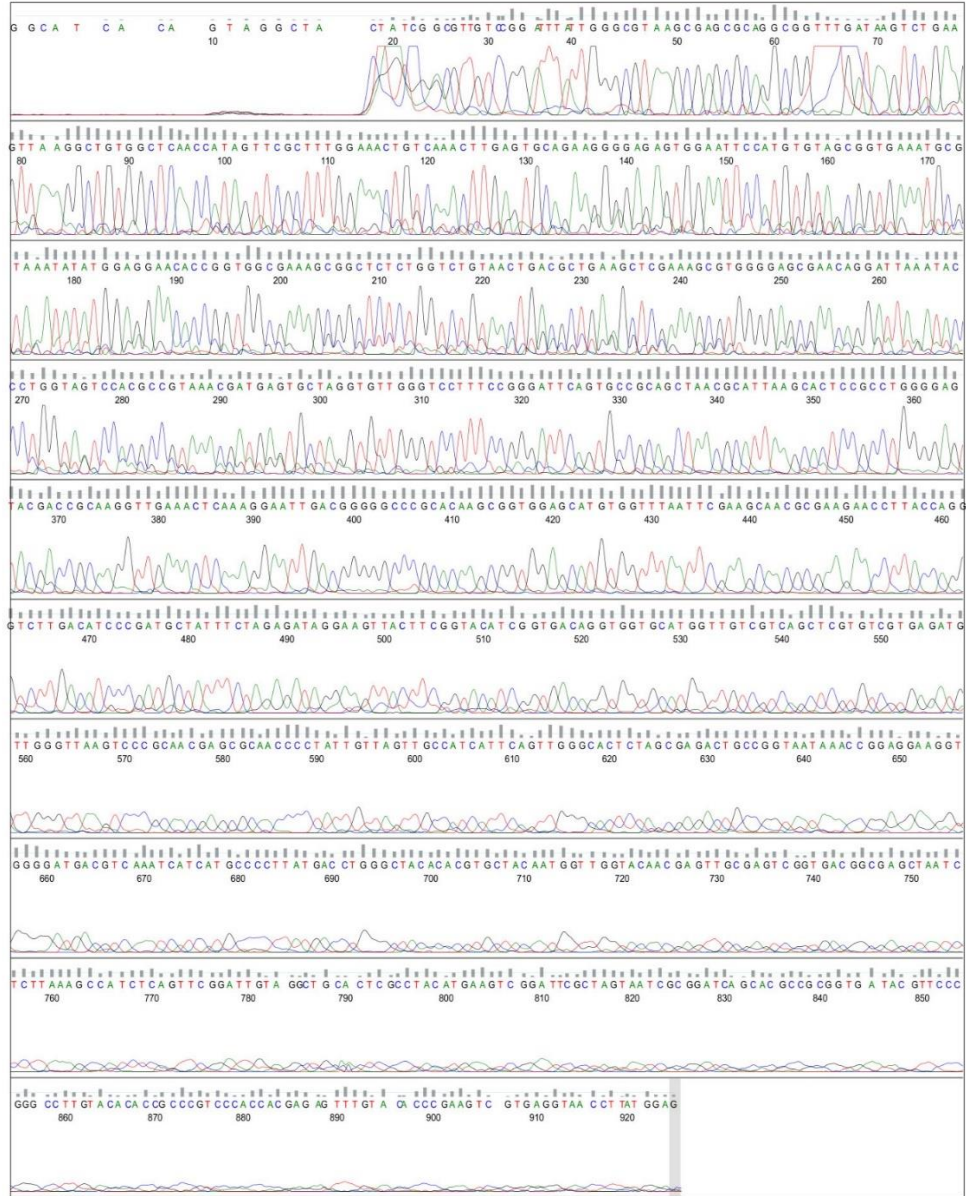
Lane/Cap#: 10

Spacing: 12

Matrix: n/a

Comment: n/a

Direction: Native



Printed: Tem 11, 2017 6:25PM

FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

EK.A.5. *S.thermophilus* MAS-5 suşunun PCR ile elde edilen (16 S RNA forward transkripsiyon) sekans dizileri.

File: 7-515F_A03.ab1

Geospiza
www.geospiza.com

Sample Name: 7-515F

Signal Strengths: A = 90, C = 83, G = 100, T = 100

Mobility: KB_3100_POP4_BDTv3.mob

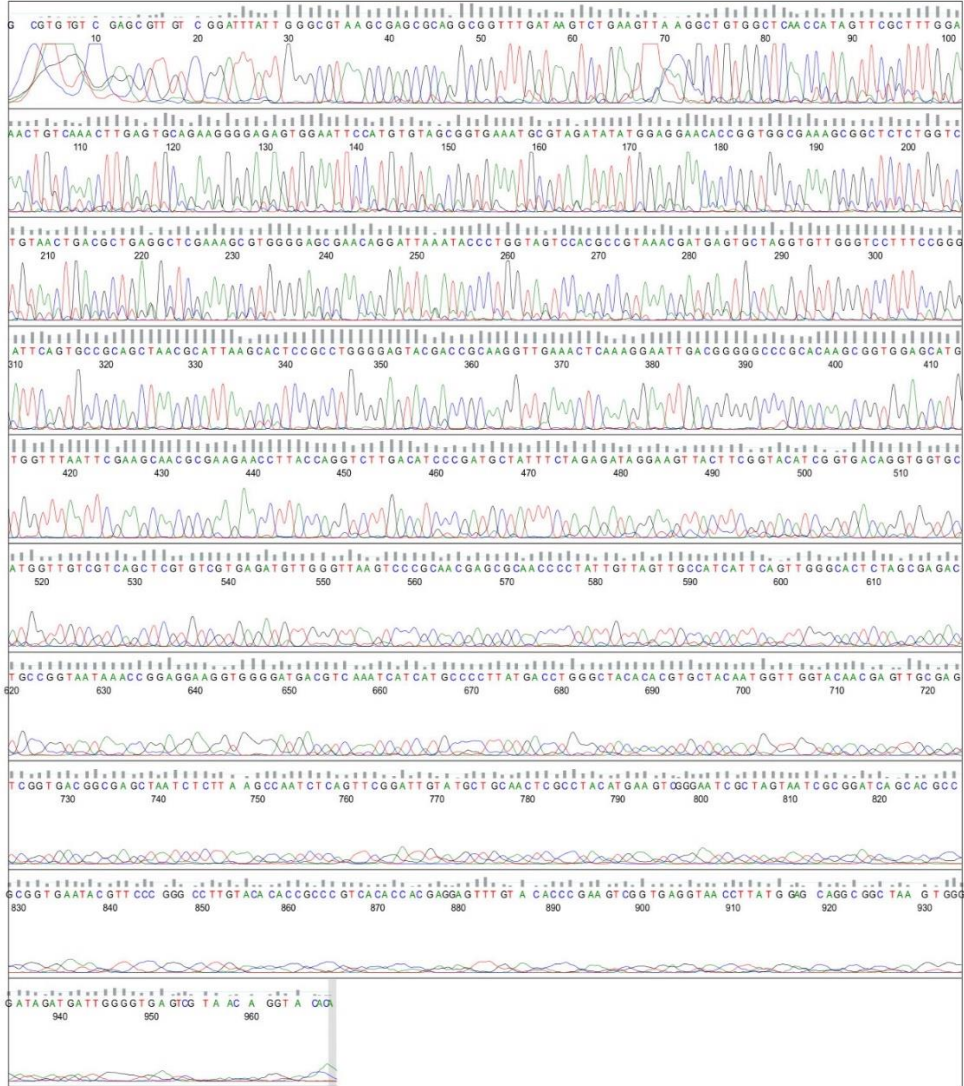
Lane/Cap#: 1

Spacing: 13.8298

Matrix: n/a

Comment: n/a

Direction: Native



Printed: Tem 11, 2017 6:26PM

 FinchTV v.1.4.0

Page 1 of 1

EK.B. *S.thermophilus* MAS suşlarının antibiyotik hassasiyeti inhibisyon zon değerleri.

<i>S.thermophilus</i> suşları	AK	AP X	B	C	K	NA	OFX	P	PB	SXT
MAS-1	9.28±0.32	-	-	24.07±0.73	10.69±1.15	-	19.97±0.51	25.33±1.11	-	20.13±0.8
MAS-2	12.59±0.31	-	13.25±0.67	29.79±0.22	-	-	21.21±0.84	16.02±0.48	8.54±0.53	11.24±1.3
MAS-3	15.66±0.78	-	15.47±0.69	34.02±1.29	-	-	25.74±0.07	16.25±0.72	9.02±0.24	15.25±0.55
MAS-4	8.77±0.19	-	13.02±0.51	30.58±1.2	-	-	20.96±1.13	26.83±0.2	-	-
MAS-5	18.02±0.75	-	14.17±0.92	34.81±0.19	10.35±0.46	-	24.02±0.4	15.29±0.64	10.37±0.63	16.30±1.1

AK: Amikasin APX:Kloksasilin B:Basitrasin C:Kloromfenikol K:Kanamisin NA:Nalidiksik Asit OFX:Ofloksasin P:Penisilin PB:Polimiksin B SXT:Trimethoprim

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : AYŞE YAVUZ

Adres :Kocasinan Mahallesi Sinan Sokak Yağmenler
Apartmanı A Blok No:6 Kat:3 D:8 Lüleburgaz/
Kırklareli

E-posta adresi : aysecanyavuz@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Aksaray Üniversitesi. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji
Bölümü 2009-2013

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı
Tezli Yüksek Lisans

SERTİFİKALAR

KOSGEB Girişimcilik Sertifikası

Pedagojik Formasyon Eğitim Sertifikası (2016)

BİLİMSEL ETKİNLİKLERDE GÖREV ALMA

1)Ekoloji Sempozyumu 2010 .

BİLİMSEL ETKİNLİKLERE KATILIM

1) Yavuz, A.,16 Nisan 2013 (*Taenia saginata* Paraziti ve Yaşam Döngüsü) Dünya
Biyologlar Günü Poster Sunumu.

2) Aşan Özusağlam, M., Balık, Z., Günyaktı, A., Yavuz, A., 2014.
Opuntia ficus-indica (L.) Mill. Kladot ve Meyve Ekstrelerinin Balık
Patojenlerine Karşı Yem Katkısı Olarak Kullanım Potansiyelinin Araştırılması,
22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir Osmangazi Üniveristesi, Eskişehir,
Türkiye (Poster Sunumu).

- 3) Aşan Özüsağlam, M., Yavuz, A., Tomruk, M.N., Ertosun, Ş., Aylanç, V., 2017. Biological Activities of *Persea americana* Leaf Extracts against Food-borne and Clinical Pathogen Microorganisms. 2.Uluslararası Akdeniz Bilim ve Mühendislik Kongresi (IMSEC 2017) Çukurova Üniversitesi. Kongre Merkezi ADANA (Sözlü Sunum). s.73
- 4) Aşan Özüsağlam, M., Yavuz, A., 2018. Antioxidative Effects of *Streptococcus thermophilus* Strains from Human Breast Milk. International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2018) ANKARA 26-27 Nisan (Poster Sunumu). s.1319.
- 5) Yavuz, A., Aşan Özüsağlam, M., 2018. Investigation of Antimicrobial Activity of Jojoba Leaf Extracts and Their Potential Use as Natural Preservative to Sodium Benzoate in Food Industry. International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2018) ANKARA 26-27 Nisan (Poster Sunumu). s.1318
- 6) Aşan Özüsağlam, M., Yavuz, A., Tacer, S., 2018. Antimicrobial Potential Of Jojoba Leaf Extracts as Food Preservatives. 3.Uluslararası Akdeniz Bilim ve Mühendislik Kongresi (IMSEC 2018) Çukurova Üniversitesi. Kongre Merkezi ADANA 24-26 Ekim 2018 (Poster Sunumu). s.112.
- 7) Aşan Özüsağlam, M., Yavuz, A., Tacer, S., 2018. Investigation of Potential Use of Palm Fruit Extracts and Their Combination with Probiotic Candidate Strains for Food Industry. 3.Uluslararası Akdeniz Bilim ve Mühendislik Kongresi (IMSEC 2018) Çukurova Üniversitesi. Kongre Merkezi ADANA 24-26 Ekim 2018 (Sözlü Sunum). s.113.
- 8) Aşan Özüsağlam, M., Yavuz, A., 2018. Avokado Yaprak Ekstrelerinin Su Ürünlerinde Doğal Yem Katkısı Olarak Kullanım Potansiyelinin Araştırılması. Uluslararası Tarım, Çevre ve Sağlık Kongresi / 26-28 Ekim 2018 . Aydın International Agriculture. Environment and Health Congress / 26-28 October 2018. Aydın (Poster Sunumu). s.210.

Projeler

- 1) *Gryllotalpa gryllotalpa*'dan Elde Edilmiş Kitosanın Antimikrobial ve Antioksidan Aktivitelerinin Araştırılması (ASÜ BAP 2015-051) **Yardımcı Araştırmacı**

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

1. Aksaray Şehit Ali Er Anadolu Lisesi (Biyoloji Öğretmeni)/ Formasyon Eğitimi Stajı

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR. SUNUMLAR VE PATENTLER

Kongrelerde Sunulan Makaleler

1. YAVUZ, A., AŞAN ÖZÜSAĞLAM, M., 26-28 October 2018 . Anne Sütü Orijinli *Streptococcus thermophilus* Suşlarının Bazı Teknolojik Özellikleri, Uluslararası Tarım, Çevre ve Sağlık Kongresi Aydın International Agriculture, Environment and Health Congress Aydın (Sözlü Sunum). s.16.