



**FARKLI FORMÜLASYONLARLA ELDE
EDİLMİŞ SİNBİYOTİKLERİN BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Melisa AYHAN

Eskişehir 2025

**FARKLI FORMÜLASYONLARLA ELDE EDİLMİŞ SİNBİYOTİKLERİN
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

Melisa AYHAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Zerrin CANTÜRK

Anadolu Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Temmuz 2025

Eskişehir

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü tarafından BGT-2024-2459 proje numarası ile desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Melisa Ayhan'ın 'Farklı Formülasyonlarla Elde Edilmiş Sinbiyotiklerin Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi' başlıklı tezi 03/07/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Mikrobiyoloji Ana Bilim dalında Tezli Yüksek Lisans Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Ünvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Danışman) :	Prof. Dr. Zerrin CANTÜRK	
Üye :	Prof. Dr. Miriş DİKMEN	
Üye :	Doç. Dr. Volkan KILIÇ	

Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖZET

FARKLI FORMÜLASYONLARLA ELDE EDİLMİŞ SINBİYOTİKLERİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Melisa AYHAN

Farmasötik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı

Tezli Yüksek Lisans Programı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Temmuz 2025

Danışman: Prof. Dr. Zerrin CANTÜRK

Probiyotikler ve prebiyotiklerin birlikte kullanılmaları sinerjik etki yaratmakta ve bağırsakta canlı probiyotik hücre sayısının artmasını sağlamaktadır. Prebiyotikler doğal veya sentetik olarak elde edilebilen, şeker poliollerini içeren sindirilmeyen karbonhidrat molekülleridir. Gastrointestinal sistemde bulunan bağırsak mikroorganizmalarını besleme, metabolik aktivitelerini önemli ölçüde iyileştirme, sindirimi, besin emilim kapasitesini ve bağışıklık sistemini iyileştirme yeteneği nedeniyle patojenik mikroorganizmaların büyümesini engellerler. Prebiyotikler, asidik ortamlarda kalma ve ince bağırsaktaki çeşitli sindirim enzimlerine karşı direnci koruma yeteneğine sahiptir böylece fermente edilen ve kısa zincirli yağ asitlerinin üretimine yol açan yararlı bağırsak mikroorganizmalarının büyümesini sağlar. Tez kapsamında, kolostrumdan izole ettiğimiz probiyotik bakterileri beş farklı prebiyotik ile farklı kombinasyonlarla formülize edip besiyerlerinde geliştirerek biyolojik aktivitelerini belirledik. Çalışmada farklı formülasyonlarla elde edilecek olan sinbiyotiklerin; gıda takviyesi, kozmetik, hayvan sağlığı gibi birçok alanda kullanılabilme potansiyellerini ortaya çıkaracak ve kullanım alanlarına uygun formda ürün tasarlama açısından zengin bir kaynak oluşturacaktır.

Anahtar Kelimeler: Probiyotik, Prebiyotik, Sinbiyotik, Laktik asit bakterileri

ABSTRACT

DETERMINATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF SYNBIOTICS OBTAINED WITH DIFFERENT FORMULATIONS

Melisa AYHAN

Department of Pharmaceutical Microbiology

Master's Program With Thesis

Anadolu University, Postgraduate Education Enstitute, July 2025

Supervisor: Prof. Dr. Zerrin CANTÜRK

The combined use of probiotics and prebiotics creates a synergistic effect and increases the number of live probiotic cells in the intestine. Prebiotics are indigestible molecules containing sugar polyols that can be obtained naturally or synthetically. They nourish intestinal microorganisms located in the gastrointestinal tract, inhibit the growth of pathogenic microorganisms due to the ability to significantly improve their metabolic activity, improve digestion, nutrient absorption capacity and the immune system. Prebiotics have the ability to persist in acidic environments and maintain resistance to various digestive enzymes in the small intestine, thereby enabling the growth of beneficial intestinal microorganisms that ferment and lead to the production of short-chain fatty acids. Our aim in this study is to determine the biological activities of probiotic bacteria isolated from colostrum and five different prebiotic sources by cultivating them in media formulated with different combinations. The synbiotics to be obtained with different formulations in the study will reveal their potential to be used in many areas such as food, cosmetics, animal health and will create a rich source in terms of designing products in a form suitable for use.

Keywords: Probiotic, Prebiotic, Synbiotic, Lactic acid bacteria

03/07/2025

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan ‘Bilimsel İntihal Tespit Programı’yla tarandığını ve hiçbir şekilde ‘intihal içermediğini’ beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Melisa AYHAN

İmza

STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES

I hereby truthfully declare that this thesis is an original work prepared by me; that I have behaved in accordance with the scientific ethical principles and rules throughout the stages of preparation, data collection, analysis and presentation of my work; that I have cited the sources of all the data and information that could be obtained within the scope of this study, and included these sources in the references section; and that this study has been scanned for plagiarism with ‘Scientific Plagiarism Detection Program’ used by Anadolu University, and that ‘it does not have any plagiarism’ whatsoever. I also declare that, if a case contrary to my declaration is detected in my work at any time, I hereby express my consent to all the ethical and legal consequences that are involved.

Melisa AYHAN

İmza

TEŞEKKÜR

Tezimin başından sonuna kadar geçen süre boyunca bilgi birikimi ve tecrübeleri ile desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Zerrin CANTÜRK'e;

Laboratuvar çalışmalarım süresince her sorduğum soruyu sabırla cevaplayan, akademik olarak her zaman beni daha iyiye yönlendiren, sohbet ve enerjileriyle beni hep dinç tutan sevgili hocam Öğr. Gör. Dr. Pervin SOYER ve Arş. Gör. Mustafa Güçlü ÖZARDA'ya;

Bilgi ve birikimlerinin yanısıra destekleriyle de yanımda olan Dr. Emine İRDEM'e, yüksek lisans arkadaşım Rabia BOZ ADIYAMAN'a;

Bu süreçte Eskişehir'de ikinci ailem olan canım halam Nezaket YILMAZ, eniştem Ömer YILMAZ ve kuzenim Hüseyin YILMAZ'a;

Enerjim her tükendiğinde elimden tutan canım arkadaşım Fatma Nur YILMAZ'a;

Aldığım her kararda yanımda duran ve beni her zaman destekleyen canım annem Ayşe AYHAN, babam Recep AYHAN, dedem Huşut AYHAN, abim Ahmet AYHAN ve ablam Şerife FIRAT'a;

Hayatımda attığım her adımda izi bulunan canım dostum Mürşide TÜRÜT'e sonsuz teşekkür ederim.

03/07/2025

ETİK KURUL BELGESİ BEYANNAMESİ

Bu tez çalışmasının hazırlanmasında, yürütülmesinde, verilerin analizinde Etik Kurul İzni'ne gerek yoktur.



Melisa AYHAN

İmza

ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ KULLANIM BEYANI

Bu tez çalışmasının hazırlanması, yürütülmesi, verilerin analizi vb. aşamalarının herhangi birinde üretken yapay zekâ programlarından yararlanmadığımı beyan ederim.

Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.



Melisa AYHAN

İmza

03/07/2025

DECLARATION OF GENERATIVE ARTIFICIAL INTELLIGENCE USAGE

I declare that I have not used generative artificial intelligence programs at any stage of the preparation, execution, data analysis, etc. of this study.

I also declare that, if a case contrary to my declaration is detected in my work at any time, I hereby express my consent to all the ethical and legal consequences that are involved.

A large, light gray, stylized signature watermark is positioned diagonally across the lower half of the page. It appears to be a combination of the letters 'X' and 'K' in a bold, geometric font.

Melisa AYHAN

İmza

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	v
STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES	vi
TEŞEKKÜR	vii
ETİK KURUL BELGESİ BEYANNAMESİ	viii
ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ KULLANIM BEYANI.....	ix
DECLARATION OF GENERATIVE ARTIFICIAL INTELLIGENCE USAGE....	x
İÇİNDEKİLER	xi
TABLolar DİZİNİ	xvii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xxi
GÖRSELLER DİZİNİ	xxv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxvii
1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
2 KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1 Kolostrum.....	3
2.1.1 Kolostrumun bileşimi	3
2.1.2 Kolostrumun mikrobiyal yapısı.....	5
2.2 Prebiyotikler	7
2.2.1 Prebiyotik çeşitleri	11
2.2.1.1 <i>β-Glukan</i>	12

2.2.1.2 Frukthanlar (FOS, oligofruktoz, inülin)	12
2.2.1.3 Galakto-oligosakkaritler (GOS)	14
2.2.1.4 İzomaltooligosakkaritler (IMO)	14
2.2.1.5 Laktuloz.....	15
2.2.1.6 Dirençli Nişasta (RS)	15
2.2.1.7 Ksilooligosakkaritler (KSO)	16
2.2.1.8 Soyaoligosakkaritleri (SOS)	16
2.2.1.9 Gentiooligosakkarit (GLOS)	16
2.2.1.10 Palatinoz.....	17
2.2.1.11 Kitosan-oligosakkaritleri (KOS)	17
2.2.1.12 Polidekstroz	17
2.2.1.13 Pektin-oligosakkaritleri (POS)	17
2.2.1.14 Rafinoz	18
2.2.1.15 Arabinoksilooligosakkaritler (AKSO)	18
2.2.1.16 Polifenoller.....	18
2.2.1.17 Mannan-oligosakkaritler (MOS)	18
2.3 Probiyotikler	19
2.3.1 Probiyotiklerin insan sağlığına etkileri ve mekanizması.....	20
2.3.2 Probiyotik mikroorganizmalar	22
2.4 Postbiyotikler	23
2.5 Sinbiyotikler	24
3 MATERYAL VE YÖNTEM.....	27
3.1 Materyal	27
3.1.1 Besi ortamları.....	27
3.1.1.1 MRS broth	27
3.1.1.2 MRS agar	27

3.1.1.3 M17 broth.....	28
3.1.1.4 M17 agar	29
3.1.1.5 Nutrient broth	29
3.1.1.6 Nutrient agar.....	30
3.1.1.7 Mueller hinton broth	30
3.1.1.8 Mueller hinton agar.....	31
3.1.1.9 Sabouraud dekstroz broth.....	31
3.1.1.10 Sabouraud dekstroz agar.....	31
3.1.1.11 Kanlı agar.....	32
3.1.1.12 Nişastalı agar	32
3.1.1.13 Skim milk agar.....	32
3.1.1.14 Sodyum fitatlı agar	33
3.1.1.15 Tribütrinli agar	34
3.1.1.16 MRS broth %0.03 safra tuzu ilaveli.....	34
3.1.1.17 MRS broth %0.1 safra tuzu ilaveli.....	34
3.1.1.18 MRS broth %0.3 safra tuzu ilaveli.....	34
3.1.1.19 MRS broth %0.6 safra tuzu ilaveli.....	35
3.1.1.20 pH 2 ve pH 3 MRS broth ortamı	35
3.1.2 Standart bakteri suşları	35
3.1.3 Kullanılan araç ve gereçler	36
3.1.4 Kullanılan kimyasallar, çözeltiler ve boyalar	37
3.1.4.1 %20'lik gliserol çözeltisi	37
3.1.4.2 %0.9'luk fizyolojik tuzlu su	37
3.1.4.3 %3'lük Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) çözeltisi	37
3.1.4.4 0.1 M HCl çözeltisi ve 0.1 M NaOH çözeltisi.....	37
3.1.4.5 DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) çözeltisi	38

3.1.4.6 %0.01'lik Resazürin çözeltisi.....	38
3.1.4.7 Askorbik asit çözeltisi.....	38
3.1.4.8 Kloramfenikol çözeltisi	38
3.1.4.9 Gram boyama seti	38
3.1.4.10 Fenolftalein	38
3.2 Yöntem.....	38
3.2.1 Kolostrum örneklerinin temini.....	38
3.2.2 Kolostrum örneklerinden mikroorganizma izolasyonu	39
3.2.3 İzole edilen mikroorganizmaların tanımlanması.....	39
3.2.3.1 Gram boyama testi	39
3.2.3.2 Katalaz testi	40
3.2.3.3 Hemolitik aktivite tayini	40
3.2.4 LAB izolatlarının probiyotik özelliklerinin belirlenmesi.....	41
3.2.4.1 Asit direncinin belirlenmesi.....	41
3.2.4.2 Safra tuzu direncinin belirlenmesi.....	41
3.2.4.3 Antimikrobiyal aktivite tayini	41
3.2.4.3.1 Agar kuyucuk difüzyon metodu	42
3.2.4.3.2 Mikrodilüsyon metodu	42
3.2.4.4 Antioksidan aktivitenin belirlenmesi.....	43
3.2.5 Moleküler identifikasyon	44
3.2.5.1 Bakteri DNA izolasyon protokolü	44
3.2.6 Prebiyotiklerin hazırlanması	46
3.2.7 Bakterilerin enzim taramaları.....	47
3.2.7.1 Lipaz aktivitesinin tespiti	47
3.2.7.2 Amilaz aktivitesinin tespiti.....	47
3.2.7.3 Proteaz aktivitesinin tespiti.....	47

3.2.7.4 Fitaz aktivitesinin tespiti.....	48
3.2.8 Fermentasyon sıvılarının organik asit tayini	48
3.2.8.1 Laktik asit üretim tayini.....	48
4 BULGULAR.....	49
4.1 Kolostrumdan Mikroorganizma İzolasyonu.....	49
4.2 İzolatların Tanımlanması.....	49
4.2.1 Gram boyama ve katalaz testi sonuçları	49
4.3 İzole Edilen Mikroorganizmaların Probiyotik Özelliklerinin Değerlendirilmesi.....	51
4.3.1 Asit direncinin belirlenmesi	51
4.3.2 Safra tuzu direncinin belirlenmesi	52
4.3.3 İzolatların hemolitik aktivite sonuçları	53
4.3.4 Antimikrobiyal aktivite tayini	54
4.3.4.1 Agar kuyucuk difüzyon metodu	54
4.3.4.2 Mikrodilüsyon yöntemi	60
4.3.5 Antioksidan aktivitenin belirlenmesi	64
4.4 Prebiyotiklerin Hazırlanması	66
4.5 Bakterilerin Enzim Taramaları.....	81
4.5.1 Lipaz aktivitesinin tespiti	82
4.5.2 Amilaz aktivitesinin tespiti.....	83
4.5.3 Proteaz aktivitesinin tespiti.....	84
4.5.4 Fitaz aktivitesinin tespiti	85
4.6 Fermentasyon Sıvılarının Organik Asit Tayini	87
4.6.1 Laktik asit üretim tayini	87
4.6.2 Asetik asit üretim tayini	89
4.6.3 Bütirik asit üretim tayini.....	90

4.7 Moleküler İdentifikasyon.....	91
5 SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	92
5.1 Sonuç ve Tartışma.....	92
5.2 Öneriler	100
KAYNAKÇA	101
ÖZGEÇMİŞ	



TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1 Sığır Kolostrumunun Bileşimi.....	4
Tablo 2.2 Farklı Günlerde İneklerden Alınan Sütte Baskın Bulunan Bakteri Taksonları ..	6
Tablo 2.3 Holstein Cinsi 70 Tane İnekten Alınan Kolostrumun İçerdiği Bakteri Taksonları ve Parite Farklarına Göre Yüzde Oranları	7
Tablo 2.4 Prebiyotiklerin Doğal Kaynakları	10
Tablo 2.5 Prebiyotiklerin Moleküler Yapısı	12
Tablo 2.6 İnsan Beslenmesinde En Sık Kullanılan Probiyotik Mikroorganizmalar	22
Tablo 2.7 Yaygın Olarak Kullanılan Sinbiyotikler	25
Tablo 3.1 MRS Broth Besiyeri İçeriği	27
Tablo 3.2 MRS Agar Besiyeri İçeriği	27
Tablo 3.3 M17 Broth Besiyeri İçeriği	28
Tablo 3.4 M17 Agar Besiyeri İçeriği	29
Tablo 3.5 Nutrient Broth Besiyeri İçeriği	29
Tablo 3.6 Nutrient Agar Besiyeri İçeriği	30
Tablo 3.7 Mueller Hinton Broth Besiyeri İçeriği	30
Tablo 3.8 Mueller Hinton Agar Besiyeri İçeriği	31
Tablo 3.9 Sabouraud Dekstroz Broth Besiyeri İçeriği	31
Tablo 3.10 Sabouraud Dekstroz Agar Besiyeri İçeriği	32

Tablo 3.11 Skim Milk Agar Besiyeri İçeriği	33
Tablo 3.12 Sodyum Fitatlı Agar Besiyeri İçeriği	33
Tablo 3.13 Tribütrinli Agar Besiyeri İçeriği.....	34
Tablo 3.14 Kullanılan Standart Bakteri Suşları	35
Tablo 3.15 Kullanılan Araç ve Gereçler ile Markaları	36
Tablo 4.1 İnek Kolostrumu ve Keçi Sütünden Elde Edilen İzolatların Kodları ve Özellikleri.....	50
Tablo 4.2 İzolatların Fermantasyon Sıvılarının Test Bakterileri Üzerinde Oluşturduğu Zon çapları (mm).....	55
Tablo 4.3 H1 İzolatının Modifiye Besiyerlerindeki Fermantasyon Sıvılarının Test Bakterileri Üzerinde Oluşturduğu Zon çapları (mm).....	56
Tablo 4.4 H8 İzolatının Modifiye Besiyerlerindeki Fermantasyon Sıvılarının Test Bakterileri Üzerinde Oluşturduğu Zon çapları (mm).....	56
Tablo 4.5 1.4.3 İzolatının Modifiye Besiyerlerindeki Fermantasyon Sıvılarının Test Bakterileri Üzerinde Oluşturduğu Zon çapları (mm)	56
Tablo 4.6 1.3.1 İzolatının Modifiye Besiyerlerindeki Fermantasyon Sıvılarının Test Bakterileri Üzerinde Oluşturduğu Zon çapları (mm)	57
Tablo 4.7 2.4 İzolatının Modifiye Besiyerlerindeki Fermantasyon Sıvılarının Test Bakterileri Üzerinde Oluşturduğu Zon çapları (mm).....	57
Tablo 4.8 Lsp3 İzolatının Modifiye Besiyerlerindeki Fermantasyon Sıvılarının Test Bakterileri Üzerinde Oluşturduğu Zon çapları (mm).....	57
Tablo 4.9 <i>L. casei</i> İzolatının Modifiye Besiyerlerindeki Fermantasyon Sıvılarının Test Bakterileri Üzerinde Oluşturduğu Zon çapları (mm).....	58
Tablo 4.10 <i>L. reuteri</i> İzolatının Modifiye Besiyerlerindeki Fermantasyon Sıvılarının Test Bakterileri Üzerinde Oluşturduğu Zon çapları (mm).....	58

Tablo 4.11 <i>L. rhamnosus</i> İzolatının Modifiye Besiyerlerindeki Fermantasyon Sıvılarının Test Bakterileri Üzerinde Oluşturduğu Zon Çapları (mm).....	58
Tablo 4.12 <i>L. plantarum</i> İzolatının Modifiye Besiyerlerindeki Fermantasyon Sıvılarının Test Bakterileri Üzerinde Oluşturduğu Zon Çapları (mm).....	59
Tablo 4.13 <i>A. muciniphila</i> İzolatının Modifiye Besiyerlerindeki Fermantasyon Sıvılarının Test Bakterileri Üzerinde Oluşturduğu Zon Çapları (mm).....	59
Tablo 4.14 <i>S. cerevisiae</i> İzolatının Modifiye Besiyerlerindeki Fermantasyon Sıvılarının Test Bakterileri Üzerinde Oluşturduğu Zon Çapları (mm).....	59
Tablo 4.15 <i>B. bifidum</i> İzolatının Modifiye Besiyerlerindeki Fermantasyon Sıvılarının Test Bakterileri Üzerinde Oluşturduğu Zon Çapları (mm).....	60
Tablo 4.16 İzolatların Süpernatantlarının MİK Değerleri.....	61
Tablo 4.17 Ticari Suşlar ve İzolatların Yer Elması, İnülin, Şeker Pancarı Küspesi Modifiye Besiyerleri Süpernatantlarının DPPH Deneyi ile % Antioksidan Aktiviteleri.....	65
Tablo 4.18 Ticari Suşlar ve İzolatların <i>S.cerevisiae</i> , Buğday Kepeği Modifiye Besiyerleri Süpernatantları ve MRS Süpernatantlarının DPPH Deneyi ile % Antioksidan Aktiviteleri.....	66
Tablo 4.19 Ticari Suşlar ve İzolatların Modifiye Besiyerlerinin %5 ve %10 Oranındaki Biyokütleleri (gram)	68
Tablo 4.20 İzolatların ve Ticari Suşların Skim Milk Agar Besiyerinde Oluşturduğu Zon Çapları (mm)	84
Tablo 4.21 Fermentasyon Sıvılarının Proteaz Aktivitesi	85
Tablo 4.22 İzolatların ve Ticari Suşların Sodyum Fitatlı Besiyerinde Oluşturduğu Zon Çapları (mm).....	85
Tablo 4.23 İzolatların ve Ticari Suşların % Laktik Asit Üretimi.....	88

Tablo 4.24 Fermentasyon Sıvılarının % Laktik Asit Üretimi.....	89
---	----



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Sığır Kolostrumundaki Besinsel ve Biyoaktif Bileşenler	4
Şekil 2.2 Bir Bileşiğin Prebiyotik Olarak İfade Edilebilmesi İçin İzlenecek Adımların Şeması	9
Şekil 2.3 Oligosakkarit Çeşitleri	11
Şekil 2.4 Fruktooligosakkaritlerin Molekül Yapısı	13
Şekil 2.5 Galaktooligosakkaritlerin Molekül Yapısı	14
Şekil 2.6 İzomaltooligosakkaritlerin Molekül Yapısı	15
Şekil 2.7 Sinbiyotik Formülasyonu	24
Şekil 4.1 İzolatların ve Ticari Suşların Seçilen Fermentasyon Sıvılarının <i>E. coli</i> ATCC 35218'e Karşı % MİK Değerleri.....	63
Şekil 4.2 İzolatların ve Ticari Suşların Seçilen Fermentasyon Sıvılarının <i>S.aereus</i> 'a Karşı % MİK Değerleri	63
Şekil 4.3 İzolatların ve Ticari Suşların Seçilen Fermentasyon Sıvılarının <i>Paeruginosa</i> 'ya Karşı % MİK Değerleri	64
Şekil 4.4 1.3.1 İzolatının %5 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi.....	69
Şekil 4.5 1.3.1 İzolatının %10 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi.....	69
Şekil 4.6 2.4 İzolatının %5 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi.....	70
Şekil 4.7 2.4 İzolatının %10 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi.....	70

Şekil 4.8 1.4.3 İzolatının %5 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi.....	71
Şekil 4.9 1.4.3 İzolatının %10 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi.....	71
Şekil 4.10 H1 İzolatının %5 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi.....	72
Şekil 4.11 H1 İzolatının %10 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi.....	72
Şekil 4.12 H8 İzolatının %5 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi.....	73
Şekil 4.13 H8 İzolatının %10 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi.....	73
Şekil 4.14 Lsp3 İzolatının %5 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi.....	74
Şekil 4.15 Lsp3 İzolatının %10 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi.....	74
Şekil 4.16 <i>A.muciniphila</i> Ticari Suşun %5 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi.....	75
Şekil 4.17 <i>A.muciniphila</i> Ticari Suşun %10 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi.....	75
Şekil 4.18 <i>B.bifidum</i> Ticari Suşun %5 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi.....	76
Şekil 4.19 <i>B.bifidum</i> Ticari Suşun %10 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi.....	76
Şekil 4.20 <i>L.reuteri</i> Ticari Suşun %5 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi.....	77

Şekil 4.21 <i>L.reuteri</i> Ticari Suşun %10 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi.....	77
Şekil 4.22 <i>L.rhamnosus</i> Ticari Suşun %5 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi.....	78
Şekil 4.23 <i>L.rhamnosus</i> Ticari Suşun %10 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi.....	78
Şekil 4.24 <i>S.cerevisiae</i> Ticari Suşun %5 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi.....	79
Şekil 4.25 <i>S.cerevisiae</i> Ticari Suşun %10 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi.....	79
Şekil 4.26 <i>L.casei</i> Ticari Suşun %5 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi.....	80
Şekil 4.27 <i>L.casei</i> Ticari Suşun %10 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi.....	80
Şekil 4.28 <i>L.plantarum</i> Ticari Suşun %5 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi.....	81
Şekil 4.29 <i>L.plantarum</i> Ticari Suşun %10 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi.....	81
Şekil 4.30 Ticari Suşlar ve İzolatların Modifiye Besiyerleri Fermentasyon Sıvılarının Lipaz Aktivitesi.....	83
Şekil 4.31 Ticari Suşlar ve İzolatların Modifiye Besiyerleri Fermentasyon Sıvılarının Fitaz Aktivitesi.....	86
Şekil 4.32 Ticari Suşlar ve İzolatların Modifiye Besiyerleri Fermentasyon Sıvılarının Laktik Asit Miktarı.....	87
Şekil 4.33 Ticari Suşlar ve İzolatların Modifiye Besiyerleri Fermentasyon Sıvılarının Asetik Asit Miktarı	90

Şekil 4.34 Ticari Suşlar ve İzolatların Modifiye Besiyerleri Fermentasyon Sıvılarının Bütirik Asit Miktarı.....	91
--	----



GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 4.1 Kolostrumdan ve Keçi Sütünden İzole Edilen Mikroorganizma Örnekleri...	49
Görsel 4.2 Katalaz Pozitif (+) ve Negatif (-) Sonuç Örneği	50
Görsel 4.3 Saf Kültür İzolatlarının Gram Boyama Örnekleri	50
Görsel 4.4 pH 2, pH 3 MRS Broth Asit Ortamında ve Kontrol Ortamı Olan pH 7 MRS Broth Ortamında İnkübe Edilen 7 Adet Saf Kültür İzolatlarının 0., 1., 2., 4. Saatlerde MRS Agarda Gelişimlerinin Petri Görüntüleri Örnekleri	51
Görsel 4.5 Kontrol Ortamı Normal MRS Broth ve %0.03, %0.1 %0.3 ve %0.6 Safra Tuzu İçeren MRS Broth Ortamında İnkübe Edilen 6 Adet Saf Kültür İzolatlarının 0., 1., 2., 4. Saatlerde MRS Agarda Gelişimlerinin Petri Görüntüleri.....	52
Görsel 4.6 Kontrol Ortamı Normal MRS Broth ve %0.03, %0.1 %0.3 ve %0.6 Safra Tuzu İçeren MRS Broth Ortamında İnkübe Edilen 6 Adet Saf Kültür İzolatlarının Gelişimleri.....	53
Görsel 4.7 Saf Kültür İzolatlarının Hemolitik Aktivite γ -Hemolitik İzolatların Petri Görüntüsü	54
Görsel 4.8 Modifiye Besiyerlerinden Elde Edilen Postbiyotiklerin Test Bakterilerine Karşı Aktivitesi.....	60
Görsel 4.9 İzolatların Fermantasyon Sıvılarının Test Bakterileri Üzerinde Oluşturduğu MİK Değerlerinin Plaka Görüntüsü.....	61
Görsel 4.10 Ticari Suşlar ve İzolatların Modifiye Besiyerleri Süpernatantlarının DPPH Deneyi ile Antioksidan Aktivitelerinin 96 Kuyucuklu Plakadaki Görüntüsü	65
Görsel 4.11 Ticari Suşlar ve İzolatların Tribütrinli Agarda Görünümü.....	82
Görsel 4.12 Ticari Suşlar ve İzolatların Nişastalı Agarda Görünümü.....	83
Görsel 4.13 Ticari Suşlar ve İzolatların Skim Milk Agarda Oluşturduğu Zonlar.....	83

Görsel 4.14 Ticari Suşlar ve İzolatların Sodyum Fitatlı Besiyerinde Oluşturduğu Zonlar.....86

Görsel 4.15 Laktik Asit Üretim Tayininde İzolatların ve Ticari Suşların Görünümü....88



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AKSO	: Arabinooligosakkaritler
atm	: Atmosfer Basıncı
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
CFU	: Koloni Oluşturan Birim
CHO	: Karbonhidrat
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
ELISA	: Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	: Amerika Gıda ve İlaç Dairesi
FOS	: Fruktooligosakkarit
FRAP	: Plazmanın Demir İndirgenme Yeteneği

FTaz	: Fruktozil Transferaz
g/L	: Gram/ Litre
GI	: Gastrointestinal
GIOS	: Gentioligosakkaritler
GOS	: Galaktooligosakkarit
GRAS	: Genel Olarak Güvenli Tanınan
IMO	: İzomaltooligosakkarit
ISAPP	: Uluslararası Probiyotikler ve Prebiyotikler Bilimsel Derneği
KSO	: Ksilooligosakkarit
KOS	: Kitosan Oligosakkaritler
KVH	: Kardiyovasküler Hastalık
L	: Litre
LAB	: Laktik Asit Bakterileri
LPS	: Lipopolisakkarit
mg	: Miligram
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHB	: Mueller Hinton Broth
MİK	: Minimum İnhibisyon Kontrol
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
MOS	: Mannan Oligosakkaritler

MÖ	: Milattan Önce
NaCl	: Sodyum Klorür
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NB	: Nutrient Broth
NDO	: Sindirilmeyen Oligosakkaritler
RS	: Dirençli Nişasta
ROS	: Rafinoz Oligosakkaritler
SCFA	: Kısa Zincirli Yağ Asitleri
SDA	: Sabouraud Dekstroz Agar
SDB	: Sabouraud Dekstroz Broth
SOS	: Soyaoligosakkarit
POS	: Pektinoligosakkaritler
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

1 GİRİŞ VE AMAÇ

İnsanoğlu her alanda sürekli ilerledikçe tüketici de birçok konuda daha fazla bilince sahip olmaya devam ediyor. Tüketiciler daha fazla bilince sahip oldukça yaşam kalitesi ile sağlığı geliştiren ve hastalık riskini azaltmayı destekleyen gıdaların kullanımı önemli ve popüler hale gelmeye devam ediyor (Bhutto vd., 2025; Mussatto & Mancilha, 2007). Bu durum bireyleri profilaktik veya tedavi edici olarak fayda sağlayabilecek gıda maddelerine yöneltmektedir. Mikrobiyota sağlığı için; insan vücudunda yaşayan mikroorganizmaların, metabolitlerin yanısıra yaşadıkları ortamın bileşimi, sağlıklı bir yaşam için hedef alınır. Mikrobiyom parçası olan mikroorganizmalar gastrointestinal sistemde bol miktarda bulunmaktadır. Burada da en çok gastrointestinal sisteme etkileri ile öne çıkan prebiyotik, probiyotik ve sinbiyotik kavramları görülmektedir (Bhutto vd., 2025; Gibson, 2004; Peruzzolo vd., 2025).

Yaklaşık 38 trilyon hücre gastrointestinal sistemdeki mikrobiyotayı oluşturmaktadır. Gastrointestinal sistem mikrobiyotası insan sağlığını doğrudan etkilemektedir ve birçok hastalığın patogenezinde önemli bir faktör olduğu kabul görmektedir. Bu nedenle mikrobiyal topluluğun konakçının yararına manipüle edilmesine karşı önem sürekli artmaktadır. Bu duruma ek olarak probiyotik kullanımı da gün geçtikçe artmaktadır. Probiyotikler; gastrointestinal sistemde bulunan bağırsak mikroorganizmalarını besleme, metabolik aktivitelerini önemli ölçüde iyileştirme, sindirimi ve besin emilim kapasitesi ile bağışıklık sistemini iyileştirme yeteneği nedeniyle patojenik mikroorganizmaların büyümesini engellemektedirler (Fehily vd., 2024). Prebiyotikler, asidik ortamlarda kalma ve ince bağırsaktaki çeşitli sindirim enzimlerine karşı direnç gösterme yeteneğine sahiptir böylece fermente edilen ve kısa zincirli yağ asitlerinin üretimine yol açan yararlı bağırsak mikroorganizmalarının büyümesini sağlamaktadırlar (Singarayar vd., 2024).

Prebiyotiklerin ve probiyotiklerin ayrı ayrı ve kombine kullanımlarıyla ilgili etkileri ile ürün grupları arttıkça sinbiyotik kavramı da çalışmalarda önemli bir yer bulmuştur. Son dönemlerde teknoloji ile sağlık alanındaki gelişmeler, probiyotik ve prebiyotikler için yeni türler, mekanizmalar ve uygulamalar üzerine odaklanmaktadır. Bilimsel alanda popüleritesi gün geçtikçe artan sinbiyotikler, prebiyotik ve probiyotiklerin kombinasyonlarıdır. Bu teknik, probiyotiklerin etkisini prebiyotik ajanlarla en üst düzeye çıkarma şansı verdiği için umut vaat eden yeni bir eğilim olarak görülmektedir.

Probiyotikler için besin kaynağı olan prebiyotiklerin birlikte kullanılmaları sinerjik etki yaratmakta ve tüketilmeleri sonrası canlı probiyotik hücre sayısının daha fazla olmasını sağlayarak yalnız kullanımlarına göre daha etkili sonuçlar vermektedir. Burada dikkat edilmesi gereken nokta prebiyotiğin, probiyotiğe özgü olarak seçilmesidir (Bouhnik vd., 2004; Guarner vd., 2024).

Bu tezde amacımız kolostrumdan izole edilen probiyotik bakterilerin beş farklı prebiyotik kaynağı ile farklı kombinasyonlarda formüle edilen besiyerlerinde geliştirilerek biyolojik aktivitelerini belirlemektir. Kullanılan prebiyotik kaynakları liyofilize edilmiş yer elması, liyofilize *Saccaromyces cerevisiae* mayası, şeker pancarı küspesi ve buğday kepeği ile kontrol olarak inülin şeklindedir. Çalışma sinbiyotiklerin gıda takviyesi, kozmetik, hayvan sağlığı gibi birçok alanda kullanılabilme potansiyellerini ortaya çıkaracak ve kullanım alanlarına uygun formda ürün tasarlama açısından zengin bir kaynak oluşturacaktır.

2 KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Kolostrum

Kolostrumun ilk olarak MÖ 275 ila 300 yılları arasındaki dönemden bahseden Sirach Kitabı'nda hayvanda doğumdan hemen sonra üretilen ve farklı kültürlerde hem tedavi hem de beslenme amaçlı kullanıldığı belirtilmiştir. Ayrıca bu dönemde kolostrum su, tuz, buğday, ateş ve demir gibi hayati önem arz eden ihtiyaçlar olarak sınıflandırılmıştır. İtalyan Doktor Luigi Spolverini tarafından 1920 yılında kolostrumun normal süt ile karşılaştırıldığında daha yüksek antikor seviyeleri göstermesi sebebiyle bebek maması olarak kullanılması fikri öne sürülmüştür. Ayrıca antibiyotikler geliştirilmeden önce, doktorlar kolostrum kullanılmasını tavsiye ederken Doktor Albert Sabin sığır kolostrumundan izole edilmiş antikorlar kullanarak ilk çocuk felci aşısını geliştirmiştir (El-Loly, 2022).

Kolostrum, doğumdan sonraki ilk 4 gün boyunca meme bezinden salgılanan ilk salgı olarak ifade edilmektedir (Abdelsattar vd., 2022; Gopal & Gill, 2000). Kolostrum yenidoğana fayda sağlayan temel besinler, bağışıklık faktörleri ve oligosakkaritlerin bileşimi bakımından benzersizdir. Kolostrum genellikle sarımtırak bir renkte olup kremi bir yapıya yakındır (El-Loly, 2022). Doğumdan sonraki günler gittikçe kolostrumun kremi yapısı bozulur, konsantrasyonu kademeli olarak azalır ve hızla olgun süte dönüşür. Olgun sütte kolostruma kıyasla yararlı besin öğeleri daha az bulunmaktadır (Khan vd., 2024) (Arslan vd., 2021). Kolostrum ayrıca yaşam iksiri, erken süt, ilk süt ve ön süt olarak da ifade edilmektedir (El-Loly, 2022).

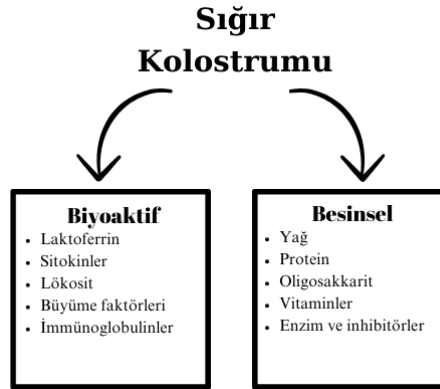
Kolostrumun bileşimini ve kalitesini etkileyen çeşitli faktörler de bulunmaktadır. Sığırın ırkı, yaptığı doğum sayısı, kolostrumun sağım zamanı, mevsim, sığırın beslenme ve hastalık durumu gibi faktörler kolostrumu etkilemektedir (Arslan vd., 2021). Son yıllarda kolostrum üzerine yapılan çalışmaların artması ve benzersiz bileşimiyle potansiyel sağlık yararları sığır kolostrumuna olan ilgiyi de artırmıştır (Khan vd., 2024).

2.1.1 Kolostrumun bileşimi

Kolostrumun bileşimi doğumdan sonra gün geçtikçe değişime uğramaktadır. Besin değeri ve içeriği olgun süte göre farklılık göstermektedir. Kolostrum olgun süte kıyasla daha düşük laktoz ve nispeten daha yüksek yağ ile protein içermektedir. Şekil 2.1'de kolostrumun biyoaktif ve besinsel bileşenleri gösterilmiştir (Ramani vd., 2024).

Şekil 2.1

Sığır Kolostrumundaki Besinsel ve Biyoaktif Bileşenler



Kaynak: Canva aracılığıyla oluşturulmuştur.

Kolostrum karbonhidratlar, yağlar, mineraller, vitaminler, proteinler, immünoreaktif bileşenler, enzimler ve zengin mikrobiyal topluluk içerdiğinden yüksek bir besin değerine sahiptir. Kolostrumun bileşimi Tablo 2.1’de gösterilmektedir (Abdelsattar vd., 2022).

Tablo 2.1

Sığır Kolostrumunun Bileşimi

Makro Bileşenler	Ortalama	Mineral ve Vitaminler	Ortalama	Biyoaktif Bileşikler	Ortalama
Protein (%)	7.1-22.6	Fosfor (mg/100 g)	148.9-359.35	α -Laktoalbümin (mg/ml)	7.91-13.8
Yağ (%)	2.0-26.5	Potasyum (mg/100 g)	95.1-551.14	β -Laktoglobülin (mg/ml)	7.9-30
Karbonhidrat (%)	2.9-8.8	Kalsiyum (mg/100 g)	157.7-359.35	Laktoferrin (mg/ml)	0.30-1.19
		Sodyum (mg/100 g)	35.4-296.78	Laktoperoksidaz (mg/ml)	13-30
		Magnezyum (mg/100 g)	24.5-139.96	Igg1 (mg/ml)	12-90
		Sülfür (mg/100 g)	88.94-414.37	IGF-1 (ng/ml)	150-991
		Demir (mg/100 g)	0.17-1.78	GH (ng/ml)	0.03-0.17
		Mangan (mg/100 g)	0.36-33.4		
		Bakır (mg/100 g)	0.64-11.4		
		Çinko (mg/100 g)	1.27-8.36		
		C Vitamini (μ g/g)	1.17-22.1		
		E Vitamini (μ g/g)	24.2-177		
		D Vitamini (μ g/g)	0.021-3.1		
		Riboflavin (μ g/g)	1.52-4.88		

Kaynak: Abdelsattar vd., 2022

Makro besin ögeleri, büyüme faktörleri, immünoglobulinler ve diğer bağışıklık faktörlerinin seviyeleri kolostrum ile olgun süt arasında önemli ölçüde farklılık gösterse de kolostrum olgun inek sütüne benzer besin maddeleri içermektedir. Kolostrum karbonhidrat açısından zengin olmasından dolayı doğal bir prebiyotik olarak kabul edilmektedir. Laktoz kolostrumda bulunan temel karbonhidrat ve birincil enerji kaynağı olarak karşımıza çıkmaktadır. Kolostrum, ω -3 ve ω -6 çoklu doymamış yağ asitlerini, fosfolipitleri, konjuge linoleik asit ve çeşitli kısa-orta zincirli esansiyel yağ asitlerini içermektedir. Bu yağ asitleri antioksidan aktivite ve immünolojik tepki üzerinde olumlu etkilere sahiptir. Kolostrumun olgun süte kıyasla daha yüksek protein içeriği olduğu belirtilmektedir. İmmünomodülatör ve antioksidatif aktiviteler gibi biyoaktif işlevlere sahip olduğu ifade edilmektedir. Kolostrum, çok sayıda mineral ve vitaminin yüksek konsantrasyonlarda içerir ve bu da onu çok besleyici bir salgı yapmaktadır. Bu bağlamda kolostrum, A vitamini (retinol ve β -Karoten), E vitamini, D vitamini ve K vitamini dahil olmak üzere yüksek konsantrasyonda yağda çözünen vitaminler içermektedir. Kolostrumun suda çözünen vitaminlerin de mükemmel bir kaynağı olduğu bilinmektedir. Bu vitaminler reaktif oksijen türlerini azaltır, iltihabı engeller ve bağırsak bağışıklık dengesini korumaya yardımcı olmaktadır. Kolostrum ayrıca çeşitli biyoaktif bileşenler de içermektedir. Bu bileşenler patojenlere karşı korumaya yardımcı olmakla beraber metabolizmaya da olumlu yönde etki etmektedir (Abdelsattar vd., 2022; Arslan vd., 2021).

2.1.2 Kolostrumun mikrobiyal yapısı

Sığır kolostrumunun zengin ve çeşitli bakteri bileşimine sahip olduğu bilinmektedir. Bu mikrobiyal zenginlik doğumdan sonraki ilk 3 gün stabil seyrederken sonraki günler boyunca dalgalanma göstermektedir (Arslan vd., 2021).

Sığır kolostrumunda dört filum baskın olarak görülmektedir. Bu dört filum *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* ve *Actinobacteria* olarak belirtilmiştir (Van Hese vd., 2022; Xie vd., 2021). Yapılan bir çalışmada ineklerden farklı günlerden alınarak elde edilen kolostrum örneklerinde *Firmicutes* (%42,38), *Bacteroidetes* (%25,09), *Proteobakteriler* (%22,86) ve *Actinobakteriler* (%7,64) baskın tür olarak görülmüştür. Kolostrumda en yaygın olarak *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleri bulunmaktadır. Ayrıca *L. paracasei*, *L. plantarum* gibi *Lactobacillus* cinslerine ait ana türler de bulunmaktadır. Tablo 2.2’de baskın bulunan bakteri türleri gösterilmektedir. Probiyotik

olarak kullanılan *Lactococcus* suşları da kolostrumun bileşiminde yer almaktadır ve bu cins bakteriler özellikle enfeksiyonlarla ilişkilendirilmektedir (Xie vd., 2021).

Tablo 2.2

Farklı Günlerde İneklerden Alınan Sütte Baskın Bulunan Bakteri Taksonları

Taksonomi	0.gün (%)	1.gün (%)	2.gün (%)	6.gün (%)
<i>Lactobacillus</i>	10.87 ± 2.18	11.53 ± 1.93	10.59 ± 3.73	7.82 ± 4.78
<i>Bacteroidetes</i>	7.27 ± 3.80	6.36 ± 0.87	5.86 ± 2.07	4.56 ± 3.05
<i>Collinsella</i>	4.75 ± 1.25	4.87 ± 0.82	4.79 ± 1.77	3.38 ± 1.85
<i>Klebsiella</i>	3.97 ± 6.44	2.97 ± 4.27	2.07 ± 3.57	2.44 ± 3.58
<i>Acinetobacter</i>	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.04	0.16 ± 0.40	9.54 ± 20.20
<i>Bifidobacterium</i>	2.49 ± 0.50	2.63 ± 0.26	2.53 ± 0.91	1.79 ± 1.04
<i>Enterococcus</i>	1.89 ± 0.31	1.84 ± 0.38	1.87 ± 0.64	1.42 ± 0.70
<i>Lactococcus</i>	0.38 ± 0.10	0.44 ± 0.15	0.55 ± 0.23	3.93 ± 8.68
<i>Staphylococcus</i>	1.31 ± 0.27	1.29 ± 0.20	1.26 ± 0.46	1.34 ± 1.13
<i>Streptococcus</i>	1.00 ± 0.18	1.06 ± 0.13	0.95 ± 0.32	1.60 ± 0.74

Kaynak: Xie vd., 2021

İki ayrı cins inekten alınan kolostrumlarla yapılan çalışmada ise yukarıda da bahsedildiği gibi *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* ve *Actinobacteria* bol bulunan bakteriler olarak ifade edilmiştir. Kolostrumda *Acinetobacter* (%16,2), *Pseudomonas* (%15,8), *Lactococcus* (%4,0), *Chryseobacterium* (%3,9), *Staphylococcus* (%3,7), *Proteus* (%1,9), *Enterococcus* (%1,8), *Streptococcus* (%1,8), *Aeromonas* (%1,7), *Vagococcus* (%1,5), *Escherichia* (%1,5), *Enhydrobacter* (%1,5), *Corynebacterium* (%1,4) ve *Sphingobacterium* (%1,3) şeklinde bakteriler belirlenmiştir (Van Hese vd., 2022).

Başka bir çalışmada ise 70 tane Holstein cinsi inekten ilk doğumu (primipar) ve çok doğumu (multipar) olarak sınıflandırılarak elde edilen kolostrumun bakteriyel çeşitliliği 16S rRNA dizi analizi yöntemi kullanılarak bakılmıştır. Her ikisinde de *Firmicutes* filumunun daha fazla oranda olduğu tespit edilmiştir. Tablo 2.3'te kolostrum örneklerinin bakteri taksonları görülmektedir (Lima vd., 2017).

Tablo 2.3

Holstein Cinsi 70 Tane İnekten Alınan Kolostrumun İçerdiği Bakteri Taksonları ve Parite Farklarına Göre Yüzde Oranları

Taksonomi	Primipar (%)	Multipar (%)
<i>Firmicutes</i>	46.1	40.8
<i>Bacteroidetes</i>	1.1	2.5
<i>Acitenobacter</i>	2.3	3.5
<i>Pseudomonas</i>	3.5	4.8
<i>Fusobacterium</i>	2.8	5.0
<i>Staphylococcus</i>	19.4	13.6
<i>Prevotella</i>	7.7	6.8

Kaynak: Lima vd., 2017

İki farklı çiftlikten toplanan kolostrumlarla yürütülen bir çalışmada ise *Bacillus circulans* (toplanan örneklerin %75’inde mevcut), *Lactobacillus plantarum* (%75) ve *Bacillus subtilis* (%55) dahil olmak üzere farklı bakteriler kolostrumda tespit edilmiştir (Chen vd., 2021).

2.2 Prebiyotikler

Bilim her geçen gün ilerledikçe tanımlar da bu gelişmelere bağlı olarak bilimsel gelişmeleri yansıtacak şekilde güncellenmektedir (Carlson vd., 2018). MÖ 470-360 yılları arasında Hipokrat, gastrointestinal (GI) sisteminin insan sağlığı ve hastalıklar için önemini dile getirmiştir. Bundan yıllar sonra 1889’da Henry Tissier insan bağırsağındaki bakterilerin sağlığa katkıda bulunabileceğini öne sürmüştür. 1921 yılında sütteki bazı bileşiklerin belirli bakterileri uyarması yoluyla insan bağırsak mikrobiyotasını değiştirebileceği ortaya çıkmıştır. Bu yıllardan sonra yürütülen çalışmalarda karbonhidratlar da dahil olmak üzere çeşitli besin maddelerinin bağırsakta yararlı bakterilerin gelişmesini sağlayabileceği ifade edilmiştir (Saville vd., 2025).

‘Prebiyotik’ kavramı ise ilk olarak Glenn Gibson ve Marcel Roberfroid tarafından 1995 yılında ortaya atılmıştır. ‘Kolondaki bir veya sınırlı sayıda bakterinin büyümesini veya aktivitesini seçici bir şekilde uyarak konakçıyı faydalı bir şekilde etkileyen ve böylece konakçı sağlığını iyileştiren sindirilemeyen bir gıda bileşeni’ olarak prebiyotik terimini tanımlamışlardır. Bu tanımlama 15 yıl boyunca neredeyse değişmemiştir ama bu tanım,

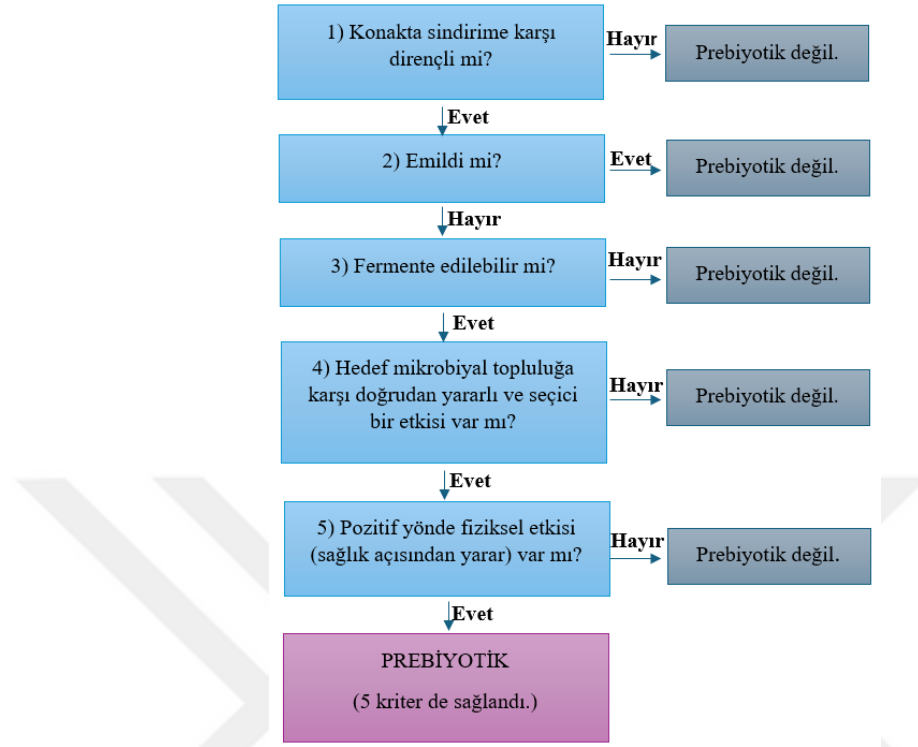
kısa ve uzun zincirli β -fruktanlar (fruktooligosakkaritler ve inülin), laktuloz ve galaktooligosakkaritler gibi karbonhidrat grubunun yalnızca birkaç bileşimini prebiyotik olarak sınıflandırmaktadır. 2008 yılında prebiyotikler, Uluslararası Probiyotikler ve Prebiyotikler Bilimsel Derneği (ISAPP) tarafından ‘gastrointestinal mikrobiyotanın bileşiminde veya aktivitesinde spesifik değişikliklerle sonuçlanan ve böylece konakçı sağlığına fayda sağlayan seçici olarak fermente edilmiş bir bileşen’ olarak tanımlanmıştır (Davani-Davari vd., 2019). Son olarak ise 2017’de ISAPP prebiyotik tanımını ‘konak mikroorganizmaları tarafından seçici olarak kullanılan ve sağlık açısından fayda sağlayan bir substrat’ olarak güncellemiştir (Gibson vd., 2017).

Bir bileşiğin prebiyotik olarak ifade edilebilmesi için belli özelliklere sahip olması gerekmektedir. Şekil 2.2’de de bu özellikler belirtilmiştir ama detaylı şekilde ifade edilecek olursa bunlar:

- GI sistemin üst kısmında sindirilmeden ve emilmeden kalın bağırsağa geçebilmeli,
- Asit ve enzimatik emilime direnmeli; oral yoldan tüketilen prebiyotikler, konak enzimleri veya mide asitleri ile kolon mikrobiyotası tarafından kullanımını engelleyecek sindirilebilir metabolitlere dönüştürülmemeli,
- Doğal mikroflora tarafından sindirilmesi/ fermente edilebilirliği; fermantasyon, mikrobiyal popülasyonun bileşiği kullanarak doğrudan veya dolaylı olarak konakçıya belirli bir fayda sağlayan metabolitler ürettiği mekanizmadır. Bu tür metabolik aktiviteler mikroflorayı değiştirebilmeli ve konakçıya başka fizyolojik faydalar sağlayabilmeli,
- Bağırsak bakterilerinin patojenler hariç büyümesini iyileştirmesi; *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* gibi faydalı bakterilerin büyümesini artırabilmeli fakat *Clostridium perfringens* gibi GI hastalıklara neden olan patojenleri arttırmamalıdır yani seçici özellik göstermeli,
- Bağırsak bakterilerini metabolik olarak değiştirmesi ve sağlığa fayda sağlaması, şeklinde sıralanabilir (Kijroongrojana vd., 2009; Saville vd., 2025; Singarayay vd., 2024).

Şekil 2.2

Bir Bileşiğin Prebiyotik Olarak İfade Edilebilmesi İçin İzlenecek Adımların Şeması



Prebiyotikler insan sağlığı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir ve bu da prebiyotiklerin kanser, kardiyovasküler hastalık (KVH), obezite ve ruhsal bozukluklara karşı insan yaşam kalitesini iyileştirmek için kullanma potansiyelini arttırmaktadır (Valcheva & Dieleman, 2016). Sağlık açısından çeşitli etkileri şu şekilde söylenebilir:

- Enfeksiyon ve antibiyotik ilişkili diyarelerin yaygınlığını ve süresini azaltmak,
- İnflamatuvar bağırsak hastalığıyla ilişkili iltihabı ve semptomları azaltmak,
- Kolon kanserini önlemede koruyucu etki sağlamak,
- Kalsiyum, magnezyum ve demir gibi minerallerin biyoyararlanımı ile emilimini artırmak,
- KVH için risk faktörlerini azaltmak,
- Bağırsaktaki *Bifidobakteri* ve *Laktobasil*’lerin sayısını artırmak,
- Tokluk hissi oluşturmak ve obeziteyi önlemek (Slavin, 2013).

Prebiyotikler, kuşkonmaz, şeker pancarı, sarımsak, hindiba, yerelması, buğday, muz, arpa, çavdar, soya fasulyesi, insan sütü, inek sütü gibi ve son zamanlarda deniz yosunları ile mikroalgler dahil olmak üzere farklı gıda ürünlerinde doğal olarak bulunmaktadır (Davani-Davari vd., 2019). Tablo 2.4’te prebiyotiklerin doğal kaynakları gösterilmektedir.

Tablo 2.4*Prebiyotiklerin Doğal Kaynakları*

Prebiyotikler	Kaynaklar
İnulin	Soğan, sarımsak, yer elması, muz, karahindiba
Laktuloz	Laktozdan sentezlenir
Fruktooligosakkaritler (FOS)	Brokoli, arpa, buğday, mantar, yaban mersini, karpuz
Galaktooligosakkaritler (GOS)	İnsan ve inek sütü, yoğurt
Soyaoligosakkaritler (SOS)	Soya fasulyesi tohumu
İzomaltooligosakkaritler (IMO)	Niştastadan sentezlenir
Glukooligosakkaritler	β -Glukan'dan ekstre edilir
Ksilooligosakkaritler (KSO)	Meyveler, sebzeler, bambu filizleri, buğday kepeği
Gentiooligosakkaritler (GİOS)	Bitki rizomları, bal
Kitosan-Oligosakkaritler (KOS)	Karides, yengeç, ıstakoz, kalamar
Pektinoligosakkaritler (POS)	Şeker pancarı küspesi, elma, narenciye kabuğu,
Polidekstroz	Dekstroz, sorbitol ve sitrik asitten sentezlenir
β -Glukan	Yulaf, arpa, mantar, tahıl
Rafinoz Oligosakkaritler (ROS)	Yabani havuç, sarımsak, baklagiller, bezelye
Arabinoksilooligosakkaritler (AKSO)	Buğday, mısır, çavdar, arpa, yulaf
Mannan-oligosakkaritler (MOS)	Tatlı patates
Polifenoller	Kahve, çay, meyve, sebze, tahıl
Dirençli Nişasta (RS)	Kaba öğütülmüş tahıllar ya da baklalar, çiğ patates, olgunlaşmamız muz
Palatinoz	Bal, şeker kamışı suyu

Kaynak: Singarayar vd., 2024

Prebiyotiklerin tüketimini ölçmek zordur çünkü bunlar çok çeşitli besin gruplarında, takviyelerde bulunmaktadır. ABD ve Avrupa diyetlerinde tahmini tüketim günde birkaç gramdır. Analitik bir test veya evrensel olarak kabul görmüş bir yöntem yoktur. Epidemiyolojik analizle ölçülmesi zor olsa da özellikle prebiyotik içeren gıdalar

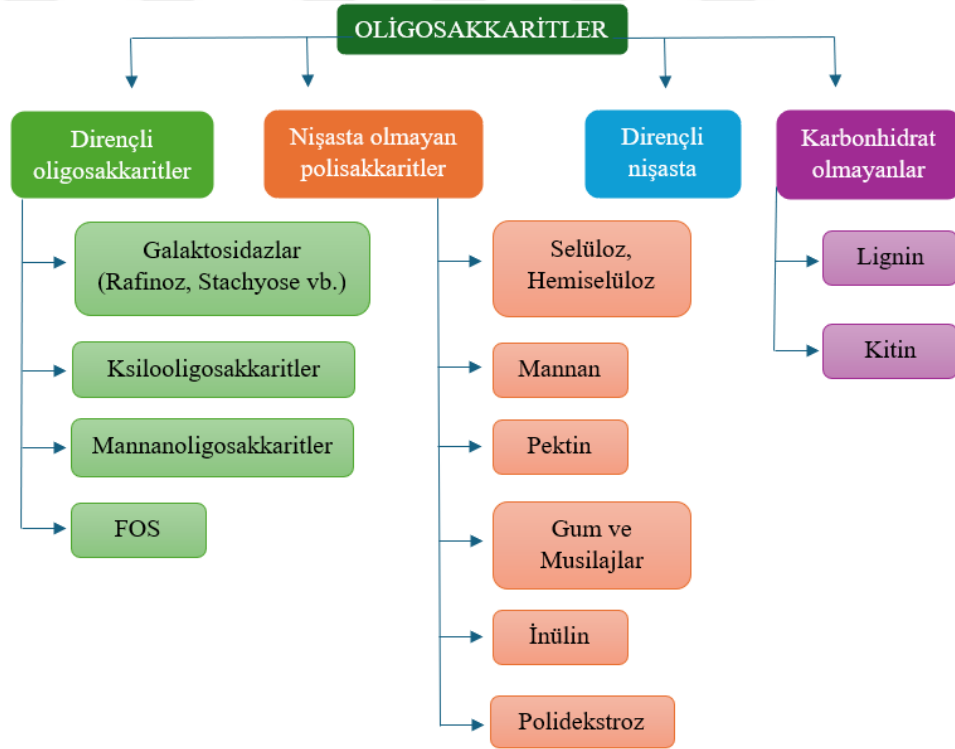
açısından fonksiyonel gıda pazarındaki artış son 20 yılda muazzam ölçüde olmuştur. Küresel olarak prebiyotik pazarının 2023 yılına kadar 7.5 milyar doları aşarak büyümeye devam etmesi beklenmektedir (Carlson vd., 2018).

2.2.1 Prebiyotik çeşitleri

Günümüzde sadece sindirilemeyen karbonhidrat (CHO) molekülleri (di-, oligo- ve polisakkarit), dirençli nişastalar ve şeker poliollerinin, inülin, GOS ve FOS gibi sindirim enzimleri tarafından sindirilemeyen karbonhidratların prebiyotik özelliklere sahip olduğu ifade edilmektedir (Singarayar vd., 2024). Oligosakkarit türevleri Şekil 2.3'te gösterilmektedir.

Şekil 2.3

Oligosakkarit Çeşitleri



Kaynak: Singarayar vd., 2024

Prebiyotiklerin asidik ortamlarda kalma ve ince bağırsaktaki sindirim enzimlerine karşı direnci koruma yeteneğine sahip olmaları ile fermente olabilmeleri kısa zincirli yağ asitlerinin (SCFA) üretimine yol açan yararlı bağırsak mikroorganizmalarının büyümesini sağlamaktadır. Bununla birlikte, FOS ve inülin bilimsel çalışmalarda en çok kullanılan prebiyotiklerdir (Al-Sheraji vd., 2013; Schwiertz Andreas, 2016; Singh vd., 2025). Sindirilemeyen oligosakkaritler (NDO) kolonda yararlı bakterilerin, özellikle

Bifidobacteria türlerinin gelişmesini sağladığı ifade edilmektedir. NDO'lar arasındaki kimyasal farklılıklar arasında monosakkarit bileşimi, zincir uzunluğu, dallanma derecesi yer almaktadır. Tablo 2.5'te de gösterildiği gibi NDO'lar bir, iki veya üç farklı monosakkarit türünden oluşabilmektedirler (Al-Sheraji vd., 2013).

Tablo 2.5

Prebiyotiklerin Moleküler Yapısı

Prebiyotikler	Moleküler yapı
Fruktooligosakkaritler (FOS)	(Fr)n-Gu
Galaktooligosakkaritler (GOS)	(Ga)n-Gu
Gentioligosakkaritler (GIOS)	(Gu)n
İzomaltooligosakkaritler (IMO)	(Gu)n
Ksilooligosakkaritler (KSO)	(Xy)n
Rafinoz Oligosakkaritler (ROS)	Ga-Gu-Fr
Soyaoligosakkaritler (SOS)	(Ga)n-Gu-Fr

Not*: Xy=Ksiloz; Fr=Fruktoz; Gu=Glikoz; Ga=Galaktoz

Kaynak: Mussatto & Mancilha, 2007

2.2.1.1 β -Glukan

β -glukanlar, tahıl tanelerinin endosperm hücre duvarlarında bulunan, β -(1,3) ve β -(1,4) glikozidik bağların bir karışımı olan doğrusal D-glukopiranosil ünitelerinden oluşan çözünür bileşiklerdir. Beslenmede β -glukanın en yüksek 2 kaynağı yulaf ve arpa olarak karşımıza çıkmaktadır. Araştırmalar β -glukanları çok sayıda aktiviteye sahip biyoaktif karbonhidratlar olarak ifade etmiştir ve ümit verici prebiyotikler olarak önermiştir. Dallanma ve uzunluk açısından çeşitlilikleri nedeniyle, β -glukanlar konak GI sistem sağlığı üzerinde çok çeşitli etkilere sahip olabilmektedir (Carlson vd., 2018).

2.2.1.2 Frukthanlar (FOS, oligofruktoz, inülin)

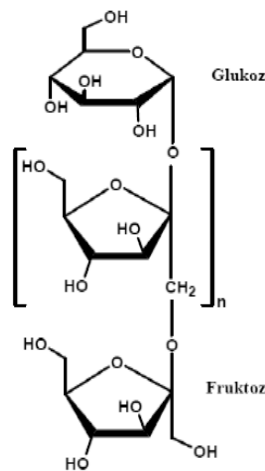
Frukthanlar, β -2,1 bağlarıyla α -glikoza bağlı fruktoz polimerleridir. Daha uzun zincirler inülin; daha kısa zincirler FOS olarak ifade edilmektedir. İnülinin hem hayvanlar hem de insanlar için toksik olmadığı ve güvenli olduğu düşünülmektedir. Yürütülen araştırmalarda, GI hastalıkları önleme ve yönetmede yararlı bir etkiye sahip olduğu ifade

edilmektedir. Oligofruktoz, inülinin kontrollü hidrolizi ile elde edilen prebiyotiktir. FOS'lar β (2-1) bağlarıyla bağlı fruktozil birimi içermektedirler ve inülinin endoinülinaz enzimi tarafından hidrolizi ile elde edilmektedirler. FDA tarafından güvenli olarak kabul edilip 'genel olarak güvenli kabul edilen (GRAS)' şeklinde ifade edilmektedirler. Yapılan çalışmalarda FOS'un bifidojenik aktiviteye sahip olduğu ve SCFA miktarını artırdığı gösterilmektedir. Ayrıca magnezyum ve kalsiyum gibi minerallerin emilimini de iyileştirilmektedir (Davani-Davari vd., 2019; Singaray vd., 2024; Wilson & Whelan, 2017).

FOS yaklaşık 36.000 bitkide bulunur fakat bunlardaki FOS konsantrasyonu prebiyotik etkilere sahip olmak için yeterli gelmemektedir. Bu nedenle FOS sentezlenmelidir ve glikozidaz ve glikoziltransferaz kullanılarak kimyasal olarak sentezlenebilir. Ancak bu reaksiyonlarda kullanılan bileşikler tehlikeli ve maliyetli olup oluşan FOS'un konsantrasyonu çok düşüktür. Bu nedenle, endüstriyel ölçekte üretilemez. Fruktozil transferaz (FTaz), FOS üretiminde önemli bir enzim olup bir ila üç fruktoz molekülünü aktararak sükrozdan FOS üretmektedir. *Aspergillus sp.*, *Aureobasidium sp.*, *Penicillium sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Fusarium sp.*, *Zymomonas mobilis*, *Bacillus macerans*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces cerevisiae* ve bazı *Laktobasil*'lerde FTaz enzimini bulundurmaktadır (Davani-Davari vd., 2019).

Şekil 2.4

Fruktooligosakkaritlerin Molekül Yapısı ($n=1-3$)



Kaynak: Ozyurt H & Otleş S., 2014

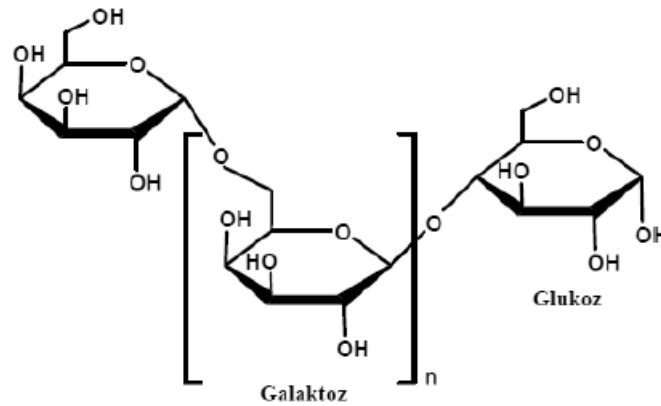
2.2.1.3 Galakto-oligosakkaritler (GOS)

GOS'lar, galaktoz içeren ve monomerler arasında β (1–3) ve β (1–4) bağları bulunan oligosakkaritlerdir. Laktozu substrat olarak kullanan β -galaktozidaz enziminin transgalaktosilaz etkisiyle üretilmektedirler. Sağlık üzerinde yararlı etkileri bulunduğu ifade edilmektedir. Bu etkiler arasında bağırsaklardaki mikroorganizmaların dengesini etkilemek, kabızlığı gidermek, minerallerin emilimini iyileştirmek, kanser gelişimini önlemek ve alerjilerin şiddetini azaltmak söylenebilir. GOS'ların saflığı, polimerizasyon derecesi, türü ve dozu, birçok klinik çalışmada prebiyotik kapasiteyi etkilemektedir (Carlson vd., 2018; Singarayar vd., 2024).

GOS oluşumu için anahtar enzimler galaktozil-transferaz ve galaktosidazdır. Galaktozil-transferaz, yüksek miktarlarda GOS üreten bir enzimdir. Fakat galaktozil-transferaz yolu ile üretim maliyetlidir. Galaktosidaz ile GOS oluşumu ise galaktosil-transferazlardan çok daha ucuzdur. β -Galaktozidazlar, *Aspergillus oryzae*, *Sterigmatomyces elviae*, *Bifidobacteria* ve *Lactobacilli* gibi farklı kaynaklardan gelmektedir. Ancak, galaktosidaz daha düşük miktarlarda GOS üretir ve bu enzim galaktosil-transferazdan daha az stereospesifiktir (Davani-Davari vd., 2019).

Şekil 2.5

Galaktooligosakkaritlerin Molekül Yapısı ($n=1-4$)



Kaynak: Ozyurt H & Otleş S., 2014

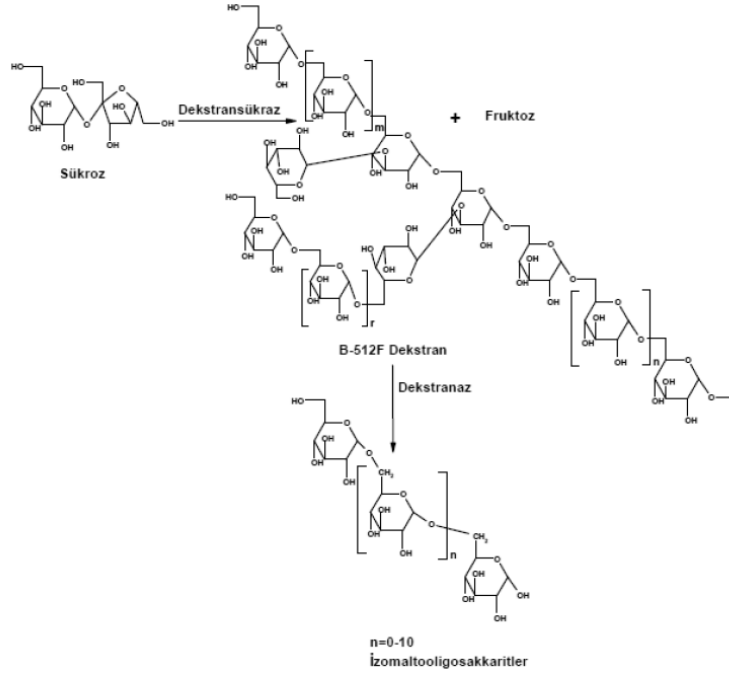
2.2.1.4 İzomaltooligosakkaritler (IMO)

IMO'lar mısır nişastasının α -amilaz, pullulanaz ve α -glukozidaz ile enzimatik işlemiyle α (1,6)-glukozidik bağlarla bağlanan glikoz monomerleridir. Yürütülen bir çalışmada bireylere 20 g/gün IMO verilmesinin, kalın bağırsaklarındaki *Bifidobacteria* miktarında

artışa sebep olduğu söylenmiştir. Buna ek olarak, IMO'nun laktik asit bakterileri tarafından sindirimi sonucu SCFA'lardan bütirat oluşturduğu da ifade edilmiştir (Carlson vd., 2018; Kijroongrojana vd., 2009; Singarayar vd., 2024)

Şekil 2.6

İzomaltooligosakkaritlerin Molekül Yapısı



Kaynak: Ozyurt H & Otleş S., 2014

2.2.1.5 Laktuloz

Laktuloz, laktozun birincil ve ikincil izomerizasyonundan türetilen galaktozil β (1,4) fruktozdan oluşan, memeli enzimleri tarafından sindirilemeyen, hidrolize edilemeyen ve ince bağırsakta emilmeyen bir disakkarittir. Hidrolize edilmezler ve ince bağırsakta emilmezler ancak kalın bağırsaktaki bakteriler tarafından fermente edilebilirler. Bu nedenle de yerleşik mikroorganizmaların popülasyonunu arttırmaktadırlar. Gıdalarda doğal olarak bulunmamakla birlikte besin değerlerini iyileştirmek için fonksiyonel bir bileşen olarak yoğurt, kurabiye, kek ve çikolata gibi çeşitli gıdalara eklenmektedir (Carlson vd., 2018; Kijroongrojana vd., 2009).

2.2.1.6 Dirençli Nişasta (RS)

RS'ler çeşitli koşullar altında oluşan birçok nişasta sınıfının geniş bir sınıflandırmasıdır. RS laboratuvar ortamında α -amilaz ve pullulanaz enzimleri tarafından parçalanamayan

ve bağırsakta fermentasyona uğrayabilen nişasta kısmı olarak ayırt edilmektedir. RS'nin beslenmeye dahil edilmesinin özellikle SCFA üreten bakterilerin büyümesini teşvik ederek bağırsak mikrobiyotasının bileşimini iyileştirip metabolik bozuklukları etkili bir şekilde çözebileceği ifade edilmektedir (Carlson vd., 2018; Singarayar vd., 2024).

2.2.1.7 Ksilooligosakkaritler (KSO)

KSO'lar sindirilemeyen ve β -1,4-ksilosidik bağlarla bağlanan ksiloz monosakkaritlerinden oluşan oligosakkaritlerdir. Mısır koçanı gibi ksilan açısından zengin tarımla ilgili yan ürünler, ticari KSO üretmek için kimyasal ön işleme ve enzimatik hidrolize tabi tutulmaktadır. KSO doğada yaygın olarak bulunmaz fakat hemiselülozun hidrolizi ile sentezlenebilirler. KSO, *Bifidobacteria* ile *Laktobasiller* tarafından hidrolize edilebilir ve probiyotik popülasyonunu artırma ile zararlı bakteri sayısını azaltmada etkili olduğu söylenmektedir (Carlson vd., 2018; Kijroongrojana vd., 2009; Singarayar vd., 2024).

2.2.1.8 Soyaoligosakkaritleri (SOS)

SOS'lar, soya fasulyesi tohumlarından elde edilmektedir. Temel olarak yapısında rafinoz ve stakiyoz oligosakkaritleri bulunur. Mide ve ince bağırsakta enzimatik sindirime dayanabilirler ve kolonda fermentasyona uğrayarak SCFA oluşturmaktadırlar. SCFA'lar enerji kaynağı olarak görev alıp hücre çeşitlenmesini teşvik etmektedirler ve bağırsak sağlığını korumaktadırlar. Ayrıca kolonda *Bifidobacteria* 'lerin büyümelerini de teşvik edebilirler. FDA tarafından GRAS olarak sertifikalandırılmışlardır (Kijroongrojana vd., 2009; Singarayar vd., 2024).

2.2.1.9 Gentiooligosakkarit (GIOS)

GIOS'lar n değerinin 1 ile 5 arasında değiştiği $\text{Glu}\beta 1-6[\text{Glu}\beta 1-6]_n$ 'den oluşan karbonhidrat polimerleridir. Mide ve ince bağırsakta hidrolizle olmazlar ve kolona ulaşana kadar parçalanmaz. Yapılan bir araştırmada GIOS FOS ile karşılaştırıldığında daha yüksek bifidojenik aktivite gösterdiği ifade edilmiştir. Ancak GIOS'un fermentasyon süreci FOS ile aynı düzeydeki seçicilikten yoksundur ve bu da prebiyotik karakterleri konusunda belirsizlik oluşturmaktadır (Singarayar vd., 2024).

2.2.1.10 Palatinoz

Palatinoz (izomaltüloz) α -1,6-glikozil bağlarıyla birbirine bağlanan glikoz ve fruktoz ünitelerinden oluşmaktadır. Ticari olarak sakkarozdaki glikozil bağlarını enzimatik olarak yeniden düzenleyerek üretilmektedir. D-glukopiranosil-1, 6-fruktoz olarak da bilinen palatinoz, düşük glisemik ile karşımıza çıkmaktadır. İnce bağırsakta tamamen parçalanmakla beraber bu işlemin hızı sakkarozla kıyasla daha yavaş olduğu görülmektedir. Sonuç olarak, özellikle diyabetli bireyler için faydalı olabilen kan şekeri ve insülin duyarlılığının azalmasını sağlayabilirler. Bu nedenle, palatinoz gıda ürünlerinde sakkarozun yerine koyulabilecek en iyi madde olarak kabul edilmektedir (Singarayar vd., 2024).

2.2.1.11 Kitosan-oligosakkaritleri (KOS)

KOS kitosanın hidrolizi sonucu oluşmaktadır ayrıca β -(1–4)-bağlı N-asetil-D-glukozamin ve deasetillenmiş glukozamin ünitelerinden oluşan bir biyopolimerdir. KOS gastrointestinal epitel membranlara nüfuz etme ve kitosana göre daha iyi hücre iletim aktivitesi sağlama potansiyeli göstermektedir (Singarayar vd., 2024).

2.2.1.12 Polidekstroz

Polidekstroz, sindirilemeyen bir oligosakkarit türü olup gıda sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadır. Sistemik olmayan bir şekilde bağlanmış ve az miktarda sorbitol ile sitrik asit içeren bir glikoz oligomeridir. Polidekstrozun *Bifidobacteria* 'lerin çoğalmasını artırdığı ve kolonda *Bifidobacteria* türlerinin gelişimine yardımcı olduğu düşünülmektedir (Davani-Davari vd., 2019; Singarayar vd., 2024).

2.2.1.13 Pektin-oligosakkaritleri (POS)

POS'lar, galakturonik asit veya ramnoz uzantısına dayanır. Bitki hücre duvarlarında bulunan doğal bir polisakkarit olan pektinin depolimerizasyonundan elde edilmektedirler. POS, özellikle bağırsak mikrobiyotasının kontrolünde olmak üzere birçok farklı özelliğe sahiptir. POS'ların oral yoldan uygulanmasının bağırsak mikrobiyotasının yapısı ve SCFA sentezi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu ifade edilmektedir (Davani-Davari vd., 2019; Singarayar vd., 2024).

2.2.1.14 Rafinoz

Rafinoz, pentahidrat olarak bulunan kristalin bir oligosakkarittir. Bileşik, 1 → 6 ve 1 → 2 pozisyonlarında glikozidik bağlarla bağlanan α-D-galaktoz, α-D-glikoz ve β-D-fruktoz olmak üzere üç monosakkarit biriminden oluşmaktadır. Rafinoz ile yürütülen çalışmalar sınırlı olmakla beraber rafinoz, şişkinliğe neden olma eğilimi nedeniyle bir anti-besin kimyasalı olarak kabul edilmiştir. Yürütülen bir çalışmada ise rafinozun bağırsak dengesizliğini kontrol edip proinflamatuvar faktörleri bloke ederek kolit kaynaklı hasta farelerin bağırsaklarını iyileştirdiğini öne sürülmektedir. Ancak net olarak bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkisi henüz açıklığa kavuşturulmamıştır (Davani-Davari vd., 2019; Singarayar vd., 2024).

2.2.1.15 Arabinoksilooligosakkaritler (AKSO)

AKSO'lar arabinoz ünitelerine bağlı doğrusal ksiloz üniteleri zincirinden oluşmaktadır. Tahılların hücre duvarlarındaki temel hemiselüloz polisakkarit olan arabinoksilanın yan ürünüdür. Tahıllarda bulunurlar ve diyet lifinin çözünür kısmının bir kısmını oluştururlar. AKSO'nun bifidojenik etkisi *in vitro* ile deneysel hayvan çalışmalarında gösterilmiştir ve bu da AKSO'nun prebiyotik potansiyeline işaret etmektedir. Ancak insan üzerindeki yapılan çalışmalar yeterli seviyede değildir (Cloetens vd., 2008; Singarayar vd., 2024).

2.2.1.16 Polifenoller

Lignanlar da dahil olmak üzere polifenoller, kolondaki mikrobiyota tarafından metabolize edilirler ve ortaya çıkan metabolitleri sağlık üzerinde olumlu etkiler göstermektedir. Bazı polifenoller, mikrobiyotanın bileşimini ve bolluğunu değiştirme yetenekleri nedeniyle prebiyotik olarak kabul edilmiştir (Saville vd., 2025; Singarayar vd., 2024).

2.2.1.17 Mannan-oligosakkaritler (MOS)

β-1,4 glikozidik bağlardan oluşan nötr bir heteropolisakkarittir. Mannoze şekerinin doğrusal zinciridir. Patojen kolonizasyonunu önlemek ve konak hayvanların bağışıklık sistemini düzenlemek için yem katkı maddesi olarak uygulanma potansiyeli olan prebiyotiklerdir. *Saccharomyces cerevisiae* mayasının hücre duvarından elde edilir. Mayadan elde edilen MOS α-1,6-glikozidik bağ içeren mannoz şekerinden oluşmaktadır (Rungrassamee vd., 2014; Singarayar vd., 2024).

2.3 Probiyotikler

Probiyotik sözcüğü, Latince ‘pro’ ve Yunanca ‘bios’ birleşmesinden oluşur ve ‘yaşam için’ anlamına gelmektedir. Probiyotik ifadesi; kelime olarak nispeten yeni olmasına rağmen, canlı bakteri içeren bazı yiyeceklerin faydalı etkileri yüzyıllardır bilinmektedir. Fakat bilim insanları bağırsak florasının zararlı mikroorganizmaların yerini yararlı mikroorganizmaların almasıyla değiştirilebileceğini ve probiyotik kavramının ortaya çıkmasını 20. yüzyılın başlarında önermişlerdir (Gasbarrini vd., 2016; ISAPP, 2019; Williams, 2010).

Probiyotiklerin kavramsallaştırılması 1900’lü yılların başlarında Paris’te Pasteur Enstitüsü’nde Nobel ödüllü Rus bilim insanı Elie Metchnikoff’a dayanmaktadır. Rus bilim insanı canlı mikroorganizma tüketmenin sağlığa faydalı olabileceği fikrini ortaya atmış ve bağırsak mikrobiyotasındaki zararlı mikroorganizmaların faydalı olanlarla değiştirilmesinin mümkün olduğunu öne sürmüştür. Metchnikoff Bulgaristan’da çalıştığı yıllarda bazı Bulgar insanların diğerlerine göre daha uzun yaşadığını fark etmiştir ve bu durumu yoğurt gibi fermente süt ürünlerinin düzenli tüketimine bağlamıştır. Bunu da Bulgar hekim Stamen Grigorov’un keşfettiği ve bu bireylerin tükettiği fermente süt ürünlerinde bulunan *Lactobacillus bulgaricus* ile ilişkilendirerek laktobasillerin hastalık ve yaşlanmaya karşı etkileri olabileceğini öne sürmüştür. Bu sırada Fransız hekim Henry Tissier tarafından, diyare olan çocukların dışkılarında farklı Y şekilli bakteriler fark edilmiştir ve bu bakterilerin sağlıklı çocuklarda bol miktarda bulunan bakteriler olduğu görülmüştür. Tissier; bu bakterilerin diyaresi olan çocuklarda bağırsak florasını iyileştirmek için kullanılabileceğini öne sürmüştür. Metchnikoff ve Tissier’in yürüttüğü çalışmalar diğer mikroorganizmaların büyümesini destekleyen mikroorganizmaları adlandırmak için bakterilerin probiyotik kullanımıyla ilgili bilimsel önerilerde bulunan ilk kişiler olarak kabul görmektedir. Probiyotik kelimesini ilk kez Alman bilim insanı Werner Kollath 1953 yılında yetersiz beslenen hastaların sağlığını iyileştirme yeteneğine sahip olduğuna inanılan çeşitli organik ve inorganik takviyeleri tanımlamak için kullanmıştır. Lilly ve Stillwell tarafından 1965 yılında ‘laktik asit üretebilen ve diğer organizmaların büyümesini uyarabilen anaerobik bakterileri içerecek’ şekilde ifade edilmiştir. Robert Parker ise 1974’te probiyotik terimini ‘bağırsak mikrobiyal dengesine fayda sağlayan organizmalar ve maddeler’ şeklinde tanımlamıştır. İngiliz bilim insanı Fuller 1992 yılında daha spesifik olarak probiyotikleri ‘bağırsak mikrobiyal dengesini iyileştirerek konağı faydalı bir şekilde etkileyen canlı mikrobiyal takviye’ olarak ifade

etmiştir. Günümüzde kabul gören tanım ise WHO ve FAO tarafından 2001 yılında ‘yeterli miktarda tüketildiğinde konakçıya sağlık açısından fayda sağlayan canlı mikroorganizmalar’ şeklinde yapılmıştır (FAO & WHO, 2001; Gasbarrini vd., 2016; ISAPP, 2019; Zawistowska-Rojek & Tyski, 2018).

Probiyotiklerde hem temel hem de klinik bilime olan ilgi son 20 yılda gittikçe artmaktadır (Fijan, 2014). Probiyotikler günümüzde sürekli büyüyen, milyarlarca dolarlık bir endüstriyi oluşturmaktadır. Küresel probiyotik pazarı 2023 yılında 87.70 milyar ABD doları değerinde olup 2024’ten 2030’a kadar %14.1’lik yıllık büyüme oranıyla genişlemesi öngörülmektedir (Bhutto vd., 2025). Tüketicilerin probiyotiklere olan artan talebi dünya çapında en yaygın tüketilen gıda takviyelerinden biri olarak karşımıza çıkmasına sebep olmuştur ve bu durum endüstriyi yönlendiren önemli bir faktördür. Bilimsel araştırmalar probiyotiklerin bağırsak sağlığını, bağışıklık fonksiyonunu ve zihinsel refahı desteklemedeki hayati rolünü vurgulamaya devam ettikçe daha fazla kişi probiyotikleri günlük rutinlerine dahil etmektedir (Bhutto vd., 2025; Suez vd., 2019).

2.3.1 Probiyotiklerin insan sağlığına etkileri ve mekanizması

Probiyotik mikroorganizmaların sağlık üzerinde yararlı etkilere yol açabilmesi; probiyotik suşa, ürüne ve alınan doza bağlı olarak değişebilmektedir. Çalışmalarda probiyotiklerin GI sisteme direnmesi ve bağırsaklara yeterli miktarlarda ulaşması için Japonya’da bir ürünün en az 10^7 CFU/g probiyotik bakteri içermesi gerekirken, ABD’de ise 10^8 CFU/g şeklinde ifade edilmiştir. Bu verilere dayanarak en az 10^6 - 10^8 CFU/g probiyotik dozu alımı elzem olduğu düşünülmektedir (Homayoni Rad vd., 2012).

Suşları probiyotik olarak ifade edebilmemiz için belli özellikleri taşımalıdır. Bunlar: mide asiditesi direnci, safra asidi direnci, mukus veya insan epitel hücrelerine ve hücre hatlarına yapışma, potansiyel olarak patojenik bakteri veya mantarlara karşı antimikrobiyal aktivite, patojeni azaltma yeteneği şeklinde ifade edilmektedir (Fijan, 2014; Kijroongrojana vd., 2009; Parhi vd., 2024).

Probiyotiklerin insan sağlığı üzerinde birçok faydası bulunmaktadır ve birçok araştırmada probiyotiklerin etkileri ortaya konmuş ve konulmaya devam etmektedir. *Lactobacillus* türleri ile 2016’da yapılan bir çalışmada doğum sonrası belirli bir süre annelerinden ayrılan farelerde ve probiyotik uygulanan farelerde uygulanmayanlara göre normal ruh haline dönmelerinde etkili bir tedavi yöntemi olduğu görülmüştür (Cowan vd., 2016).

Conrads ve arkadaşlarının *Streptococcus dentisani* ile yürüttüğü çalışmada ise probiyotik, bakteriyosin üretimi ile başlıca oral patojenlerin büyümesini inhibe etmektedir ve diş çürüklerinin temel birincil nedeni olan asidik pH'ı tamponlamaktadır sonucuna ulaşılmıştır (Conrads vd., 2018). İnsan sağlığına etkileri şu şekilde sıralanabilir:

- Bağırsak bağışıklık tepkisinin ve bağırsak homeostazının uyarılması
- Diyarenin önlenmesi ve tedavisi
- Dışkı özelliklerinin ve mikrobiyotanın iyileştirilmesi, irritabl bağırsak sendromu, inflamatuvar bağırsak hastalığı ve kabızlığın tedavisi
- Laktoz intoleransı ve diğer gıda alerjilerinin semptomlarının hafifletilmesi
- Plazma kolesterol seviyesinde azalma
- *Helicobacter pylori* eradikasyon rejimlerinin iyileştirilmesi
- HIV enfeksiyonlu çocukların ve yetişkinlerin bağışıklık tepkisini destekleyerek terapötik etkiler
- Tümör hücreleri üzerinde anti-proliferatif aktivite
- İmmün-pıhtılaştırıcı tepkileri kontrol ederek ve solunum virüslerini temizleyerek virüsle ilişkili pulmoner hasarın azaltılması (Fijan, 2014).

Vücuda alınan gıdaların bir kısmı ince bağırsakta sindirilip emilmektedir. İnce bağırsakta gıdaların sindirilmeyen kısımları yani prebiyotikler, probiyotikler tarafından kullanılmak üzere kalın bağırsağa geçmektedir. Prebiyotikler, probiyotikler tarafından fermente edildiğinde pH değerinin düşmesine neden olan ve patojenlerin inhibisyonuna sebebiyet veren büyük miktarda laktik asit üretmektedirler. Aynı zamanda SCFA; örneğin asetik, propiyonik ve bütirik asit, konakçı tarafından üretilir ve emilirler. SCFA'ların insan sağlığına faydalı etkileri bulunmaktadır. Mesela; bütirik asit, bağırsak hücre duvarının kanser hücrelerinin ilerlemesine karşı savaşmasına yardımcı olabilmektedir. Prebiyotik türleri, insan vücudunda meydana gelen metabolik süreçleri etkilemektedir. Hızlı fermente edilebilen prebiyotikler, daha yavaş fermente edilenlere kıyasla daha az faydalı olabilmektedir. Buna ek olarak hızlı bir fermantasyon oranı, konakçıda hastalığa sebebiyet veren gaz üretmeye neden olmaktadır (Kijroongrojana vd., 2009).

Probiyotiklerin yararlı etkisinin temelinde dört mekanizma bulunmaktadır:

- Antimikrobiyal maddelerin üretimi yoluyla antagonizma
- Epitelyuma yapışma ve besinler için patojenlerle rekabet

- Konakçının immünomodülasyonu
- Bakteriyel toksin üretiminin inhibisyonu

Bu mekanizmalar enfeksiyonların tedavisinde ve konakçının bağırsak mikrobiyotasının dengesinin korunmasında önemli olmaktadır. Probiyotik suşlar birlikte kümelenme yeteneği göstererek patojenik bakterilerin epitelyum kolonizasyonunu önleyen koruyucu bir bariyerin oluşumuna yol açabilmektedir. Alternatif olarak, bazı çözünür bileşenlerin salınması immünolojik hücrelerin doğrudan ya da dolaylı (epitel hücreleri aracılığıyla) aktivasyonuna sebep olabilmektedir. Bu etki, bulaşıcı hastalıkların önlenmesinde, tedavisinde ve ayrıca sindirim sistemi hastalıklarında önemli bir rol oynamaktadır. Probiyotikler toksinler gibi mikrobiyal ürünleri, konakçı ürünlerini de etkileyebilir. Bu tür etkiler, toksinlerin inaktivasyonu ve bağırsaktaki konakçı ve gıda bileşenlerinin detoksifikasyonu ile sonuçlanabilmektedir (Markowiak & Ślizewska, 2017; Oelschlaeger, 2010).

2.3.2 Probiyotik mikroorganizmalar

Probiyotik özellikler birçok bakteri ve mantar türünde görülmektedir fakat en sık kullanılan probiyotikler arasında laktik asit bakterileri (LAB), özellikle *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerine ait türleri içeren gram pozitif bakteriler şeklinde ifade edilmektedir. *Enterococcus*, *Streptococcus* ve *Bacillus* gibi diğer bakteri cinsleri ile *Saccharomyces* maya cinsinin üyeleri de probiyotik özelliklere sahiptir. *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium* ve bazı mayalar dahil olmak üzere çoğu probiyotik tür GRAS olarak sınıflandırılmaktadır. Tablo 2.6’da insan beslenmesinde en sık kullanılan probiyotik mikroorganizmalar gösterilmektedir (Mazziotta vd., 2023; Suez vd., 2019; Williams, 2010; Zawistowska-Rojek & Tyski, 2018).

Tablo 2.6

İnsan Beslenmesinde En Sık Kullanılan Probiyotik Mikroorganizmalar

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Diğer laktik asit bakterileri	Diğer mikroorganizmalar
<i>L.acidophilus</i> ^(a)	<i>B. bifidum</i> ^(a)	<i>Enterococcus faecium</i> ^(a)	<i>Bacillus clausii</i> ^(a)
<i>L.amylovorus</i> ^(b)	<i>B. breve</i> ^(b)	<i>Lactococcus lactis</i> ^(b)	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 ^(a)
<i>L.casei</i> ^{(a) (b)}	<i>B.infantis</i> ^(a)	<i>Streptococcus thermophilus</i> ^(a)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ^(a)

Tablo 2.6 (Devam) İnsan Beslenmesinde En Sık Kullanılan Probiyotik Mikroorganizmalar

<i>L.asseri</i> ^(a)	<i>B.longum</i> ^(a)
<i>L.helveticus</i> ^(a)	<i>B.adolescentis</i> ^(a)
<i>L.johnsonii</i> ^(b)	<i>B.animalis</i> ^(a)
<i>L.pentosus</i> ^(b)	
<i>L.plantarum</i> ^(b)	
<i>L.reuteri</i> ^(a)	
<i>L.rhamnusus</i> ^{(a) (b)}	

Not*: ^(a)Çoğunlukla farmasötik ürünler olarak; ^(b)Çoğunlukla gıda katkı maddeleri olarak

Kaynak: Markowiak & Ślizewska, 2017

2.4 Postbiyotikler

Postbiyotik son yıllarda popülaritesi artan bir kavram olarak karşımıza çıkmaktadır. ISAPP tarafından postbiyotik kavramı ‘konakçıya sağlık açısından yarar sağlayan cansız mikroorganizmaların ve/veya bunların bileşenlerinin preparatları’ şeklinde 2021 yılında tanımlanmıştır. Postbiyotik kanıtlanmış sağlık yararlarına katkıda bulunan metabolitler veya hücre bileşenleri içeren ya da içermeyen, kasıtlı olarak inaktive edilmiş mikrobiyal hücreler da olarak ifade edilmektedir. Buna ek olarak saflaştırılmış mikrobiyal metabolitler ve aşılar postbiyotik değildir. Postbiyotikler esas olarak bakteri içermeyen süpernatantları, SCFA’ları, bakteriyel lizatlari, ekzopolisakkaritleri, vitaminleri, enzimleri, peptitleri içermektedir (Salminen vd., 2021; Wei vd., 2024)

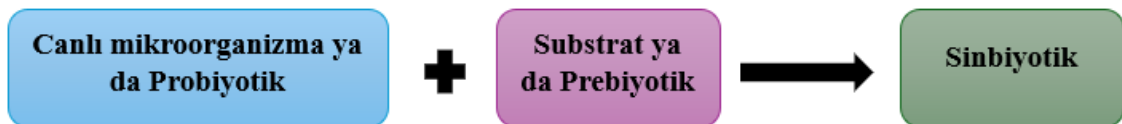
Postbiyotikler, probiyotiklerin benzer mekanizmaları aracılığıyla yararlı bir sağlık etkisi göstermektedirler. Cansız olmaları nedeniyle postbiyotikler kullanım açısından daha az risk taşımaktadırlar. Ayrıca hazırlanmaları, depolanmaları ve taşınmaları da daha kolay olmaktadır. Bu nedenle kullanım beklentileri daha geniş seyretilmektedir. Şu anda gıda üretimi, muhafazası ve fonksiyonel gıda geliştirmede kullanılmaktadırlar. Fakat eksiksiz bir düzenleyici çerçeve ve yeterli güvenlik değerlendirme verilerinin olmaması da postbiyotiklerin geliştirilmesini ve uygulanmasını sınırlamış durumdadır (Salminen vd., 2021; Wei vd., 2024; Żółkiewicz vd., 2020).

2.5 Sinbiyotikler

Sinbiyotik kavramı ilk olarak 1995 yılında Gibson ve Roberfroid tarafından ortaya atılmıştır. Sinbiyotik kelimesi Yunanca'da 'birlikte' anlamına gelen 'syn' ön eki ve 'yaşamla ilgili' anlamındaki 'biyotik' son ekinden oluşmaktadır. Gibson ve Roberfroid sinbiyotik kavramını 'gastrointestinal sistemde canlı mikrobiyal besin takviyelerinin hayatta kalmasını ve implantasyonunu iyileştirerek, bir ya da sınırlı sayıda sağlığı geliştiren bakterin büyümesini seçici olarak uyararak ve/veya metabolizmasını aktive ederek konakçı refahını iyileştirerek konakçıya fayda sağlayan probiyotik ve prebiyotik karışımı' olarak ifade etmiştir. ISAPP tarafından ise 2020 yılında sinbiyotikler 'konak mikroorganizmalar tarafından seçici olarak kullanılan ve konakçıya sağlık açısından fayda sağlayan canlı mikroorganizmalar ile substrat/substratlardan oluşan bir karışım' şeklinde tanımlanmıştır. ISAPP tarafından yapılan bu tanımlamada 'konak' mikroorganizmalar hem otokton hem de allokton mikroorganizmaları kapsamaktadır. Bu durumda her ikisi de sinbiyotiklerde substrat için hedef olabilmektedir. Bahsedilen otokton kavramı konakta yerleşik veya kolonize olanlardan bahsederken allokton probiyotikler gibi dışarıdan uygulanan maddeleri kastetmektedir. Şekil 2.7'de sinbiyotiklerin oluşturulma şekli şematize edilmiştir (Parhi vd., 2024; Swanson vd., 2020).

Şekil 2.7

Sinbiyotik Formülasyonu



Sinbiyotikler ISAPP tarafından iki alt gruba ayrılmaktadır:

- 1) Tamamlayıcı sinbiyotikler
- 2) Sinerjik sinbiyotikler

Tamamlayıcı sinbiyotikler bir probiyotik ile bir prebiyotik kombinasyonundan oluşmaktadır. Otokton mikroorganizmaların büyüüp gelişmesini teşvik etmek için tasarlanmıştır. Prebiyotikler ile probiyotikler birleştirildiğinde optimum şekilde fayda sağlanabilmektedir. Bu faydalar bu maddeleri içeren ürünlerin besin değerini ve terapötik etkisini arttırabilmektedir. Sinerjik sinbiyotikler ise substratın birlikte uygulanan mikroorganizma tarafından seçici olarak kullanılmak üzere tasarlanan bir sinbiyotik

çeşididir. Birlikte uygulanan mikroorganizmalar tarafından öncelikli olarak kullanılmaktadırlar. Burada substratlar eş zamanlı uygulanan mikroorganizmalar tarafından seçici kullanım için tasarlanmaktayken canlı mikroorganizmalar sağlığa fayda sağlayan ve seçili mikroorganizmaların büyümesi ile aktivitesini destekleme yeteneklerine göre seçilmektedir. Kullanılan substrat GI mikrobiyotadaki diğer yararlı üyeleri de zenginleştirebilir ama buradaki birincil hedef kullanılan mikroorganizmadır. Klinik çalışmalarda kullanılan sinbiyotiklerin çoğu ticari olarak temin edilebilmektedir. Ayrıca sinerjik sinbiyotiklerin etkinliğini düzenlemek, tasarlamak ve göstermek deneysel olarak bir zorluk içermektedir. Bu nedenlerden dolayı klinik çalışmalarda çoğunlukla tamamlayıcı sinbiyotikler kullanılmaktadır (Nguyen vd., 2022; Parhi vd., 2024; Swanson vd., 2020).

Sinbiyotik ürünlerde FOS ile *Lactobacillus* ya da *Bifidobacterium* cinsi bakteriler kombinasyonu en popüler olanlarıdır. Sinbiyotik formülasyonlarda başlıca kullanılan probiyotik suşları arasında *Lactobacillus*, *Bifidobacteria spp*, *S.boulardii* yer almaktadır. En sık kullanılan prebiyotikler ise yer elması, hindiba kökü gibi doğal kaynaklardan elde edilen FOS, GOS, XOS, inülin gibi oligosakkaritlerden oluşmaktadır. Tablo 2.7’de yaygın olarak kullanılan sinbiyotikler gösterilmiştir (Markowiak & Ślizewska, 2017; Pandey vd., 2015).

Tablo 2.7

Yaygın Olarak Kullanılan Sinbiyotikler

Sinbiyotikler
<i>Lactobacillus</i> cinsi bakteriler + İnülin
<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> ve <i>Bifidobacterium</i> cinsi bakteriler + FOS
<i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Enterococcus</i> cinsi bakteriler + FOS
<i>Lactobacillus</i> ve <i>Bifidobacterium</i> cinsi bakteriler + Oligofruktoz
<i>Lactobacillus</i> ve <i>Bifidobacterium</i> cinsi bakteriler + İnülin
<i>Lactococcus</i> + β -glukan
<i>Saccharomyces</i> + Hindiba kökü inülin türevi (FOS)

Kaynak: Markowiak & Ślizewska, 2017; Mounir vd., 2022

Sinbiyotiklerin tek bir üründe probiyotik ve prebiyotiğin uygun bir kombinasyonu ile bu bileşiklerin tek başına gösterdikleri aktiviteye kıyasla daha üstün bir etki sağladığı ifade

edilmektedir. Bu nedenle sinbiyotik kombinasyonlarda prebiyotiklerin sadece fermente edilebilir özelliklerini değil bununla beraber yapışma gibi probiyotik özelliklere olan etkilerini de değerlendirmek için özenli bir şekilde kategorize edilmelidirler. Burada artan yapışma bakterilerin GI sistemde kalma süresini uzatabilmektedir. Probiyotikler prebiyotikleri bir besin kaynağı olarak kullanabilmektedir ve aynı şekilde GI sistemde daha uzun süre kalmasına destek olabilmektedir. Bağırsakta da daha uzun süre kalması sağlığa olumlu yöndeki etkilerini arttıracaktır. Bu sebeple sinbiyotik kullanımı probiyotik ve prebiyotikleri bağımsız olarak kullanmaya oranla daha üstün bir etkinlik sağlamaktadır (Markowiak & Ślizewska, 2017; Nguyen vd., 2022).

Sinbiyotik tüketiminin sağlık açısından çeşitli faydaları bulunmaktadır:

- Artan *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* seviyeleri ile dengeli bağırsak mikrobiyotası,
- Karaciğer fonksiyonunun iyileştirilmesi,
- İmmünomodülatör yeteneğin iyileştirilmesi,
- Bakteriyel translokasyonun önlenmesi, şeklinde sıralanabilir (Pandey vd., 2015).

Sinbiyotikler, prebiyotik ve probiyotiklerin gittikçe popüler hale gelmesiyle beraber daha önemli bir kavram haline gelmiştir. Küresel pazardaki yeri gittikçe artmaktadır ve küresel pazarın 2023 yılına kadar 638.2 milyon ABD doları değerinde olması beklenilmektedir. Pazar büyüklüğü 2033 yılına kadar ise kadar 116.9 milyon ABD dolarına ulaşması öngörülmektedir. Gıdalarda artan zenginleştirme ile sinbiyotik ürünler pazarındaki büyüme muhtemelen katlanarak artacaktır (Parhi vd., 2024).

3 MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Besi ortamları

3.1.1.1 MRS broth

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra 1.5 atm basınçta 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Besiyeri içeriği Tablo 3.1’de gösterilmektedir.

Tablo 3.1

MRS Broth Besiyeri İçeriği

Malzeme	g/L veya mL/L
Pepton	10.0 g
Et ekstarktı	8.0 g
Maya ekstraktı	4.0 g
D (+) Glikoz	20.0 g
Dipotasyum hidrojen fosfat (K ₂ HPO ₄)	2.0 g
Tween 80	1.0 mL
Diamonyum hidrojen sitrat	2.0 g
Sodyum asetat	5.0 g
Magnezyum sülfat (MgSO ₄)	0.2 g
Mangan sülfat (MnSO ₄)	0.04 g
Distile su	1000 mL

3.1.1.2 MRS agar

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra 1.5 atm basınçta 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Besiyeri içeriği Tablo 3.2’de gösterilmektedir.

Tablo 3.2

MRS Agar Besiyeri İçeriği

Malzeme	g/L veya mL/L
Pepton	10.0 g

Tablo 3.2 (Devam) Mrs Agar Besiyeri İçeriği

Et ekstarktı	8.0 g
Maya ekstraktı	4.0 g
D(+) Glikoz	20.0 g
Dipotasyum hidrojen fosfat (K ₂ HPO ₄)	2.0 g
Tween 80	1.0 mL
Diamonyum hidrojen sitrat	2.0 g
Sodyum asetat	5.0 g
Magnezyum sülfat (MgSO ₄)	0.2 g
Mangan sülfat (MnSO ₄)	0.04 g
Agar	14.0 g
Distile su	1000 mL

3.1.1.3 M17 broth

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra 1.5 atm basınçta 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Besiyeri içeriği Tablo 3.3’te gösterilmektedir.

Tablo 3.3

M17 Broth Besiyeri İçeriği

Malzeme	g/L veya mL/L
Soya pepton	5.0 g
Et pepton	2.5 g
Kazein pepton	2.5 g
Et ekstarktı	5.0 g
Maya ekstraktı	2.5 g
Magnezyum sülfat (MgSO ₄)	0.25 g
Laktoz monohidrat	5.0 g
Askorbik asit	0.5 g
Sodyum B-gliserofosfat	19.0 g
Distile su	1000 mL

3.1.1.4 M17 agar

Besiyeri içeriği distile suda çözöldükten sonra 1.5 atm basınçta 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Besiyeri içeriği Tablo 3.4’te gösterilmektedir.

Tablo 3.4

M17 Agar Besiyeri İçeriği

Malzeme	g/L veya mL/L
Soya pepton	5.0 g
Et pepton	2.5 g
Kazein pepton	2.5 g
Et ekstarktı	5.0 g
Maya ekstraktı	2.5 g
Magnezyum sülfat (MgSO ₄)	0.25 g
Laktoz monohidrat	5.0 g
Askorbik asit	0.5 g
Sodyum B-gliserofosfat	19.0 g
Agar	14.0 g
Distile su	1000 mL

3.1.1.5 Nutrient broth

Besiyeri içeriği distile suda çözöldükten sonra 1.5 atm basınçta 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Besiyeri içeriği Tablo 3.5’te gösterilmektedir.

Tablo 3.5

Nutrient Broth Besiyeri İçeriği

Malzeme	g/L veya mL/L
Pepton	5.0 g
Et ekstarktı	1.0 g
Maya ekstraktı	2.0 g
Sodyum klorid (NaCl)	5.0 g
Distile su	1000 mL

3.1.1.6 Nutrient agar

Besiyeri içeriği distile suda çözöldükten sonra 1.5 atm basınçta 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Besiyeri içeriği Tablo 3.6’da gösterilmektedir.

Tablo 3.6

Nutrient Agar Besiyeri İçeriği

Malzeme	g/L veya mL/L
Pepton	5.0 g
Et ekstarktı	1.0 g
Maya ekstraktı	2.0 g
Sodyum klorid (NaCl)	5.0 g
Agar	14.0 g
Distile su	1000 mL

3.1.1.7 Mueller hinton broth

Besiyeri içeriği distile suda çözöldükten sonra 1.5 atm basınçta 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Mikrodilüsyon broth deneyinde çift kuvvet olacak şekilde kullanılmıştır. Çift kuvvet şeklinde kullanıldığı için besiyeri içeriği toplam 42 g olacak şekilde hazırlanmıştır. Besiyeri içeriği Tablo 3.7’de gösterilmektedir.

Tablo 3.7

Mueller Hinton Broth Besiyeri İçeriği

Malzeme	g/L veya mL/L
Mısır nişastası	1.5 g
Asit kazein pepton	17.5 g
Sığır eti ekstraktı	2.0 g
Distile su	1000 mL

3.1.1.8 Mueller hinton agar

Besiyeri içeriği distile suda çözöldükten sonra 1.5 atm basınçta 121  C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Besiyeri içeriği Tablo 3.8’de gösterilmektedir.

Tablo 3.8

Mueller Hinton Agar Besiyeri İçeriği

Malzeme	g/L veya mL/L
Mısır nişastası	1.5 g
Asit kazein pepton	17.5 g
Sığır eti ekstraktı	2.0 g
Agar	14.0 g
Distile su	1000 mL

3.1.1.9 Sabouraud dekstroz broth

Besiyeri içeriği distile suda çözöldükten sonra 1.5 atm basınçta 121  C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Besiyeri içeriği Tablo 3.9’da gösterilmektedir.

Tablo 3.9

Sabouraud Dekstroz Broth Besiyeri İçeriği

Malzeme	g/L veya mL/L
Glikoz	20.0 g
Kazein pepton	5.0 g
Et pepton	5.0 g
Distile su	1000 mL

3.1.1.10 Sabouraud dekstroz agar

Besiyeri içeriği distile suda çözöldükten sonra 1.5 atm basınçta 121  C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Besiyeri içeriği Tablo 3.10’da gösterilmektedir.

Tablo 3.10*Sabouraud Dekstroz Agar Besiyeri İçeriği*

Malzeme	g/L veya mL/L
Glikoz	20.0 g
Kazein pepton	5.0 g
Et pepton	5.0 g
Agar	14.0 mL
Distile su	1000 mL

3.1.1.11 Kanlı agar

Hemolitik aktivite tayini için kullanılmıştır. Petrilere dökülmüş olarak hazır satın alınmıştır.

3.1.1.12 Nişastalı agar

İçeriği Tablo 3.6’da belirtilmiş olan Nutrient Agar besiyeri içerisine 1 litrede 2 gram olacak şekilde nişasta eklenerek yapılmıştır. Amilaz aktivitesinin var/yok tespiti için kullanılmıştır.

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra 1.5 atm basınçta 121  C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.1.13 Skim milk agar

Proteaz aktivitesinin var/yok tespiti için kullanılmıştır.

Tablo 3.11’de belirtilen besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra 1.5 atm basınçta 121  C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Tablo 3.11*Skim Milk Agar Besiyeri İçeriği*

Malzeme	g/L veya mL/L
Skim milk tozu	10.0 g
Bakteriyolojik pepton	10.0 g
Agar	14.0 g
Distile su	1000 mL

3.1.1.14 Sodyum fitatlı agar

Besiyeri fitaz aktivitesinin var/yok tespiti için kullanılmıştır.

Besiyeri içeriği distile suda çözöldükten sonra 1.5 atm basınçta 121  C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Besiyeri içeriği Tablo 3.12’de gösterilmektedir.

Tablo 3.12*Sodyum Fitatlı Agar Besiyeri İçeriği*

Malzeme	g/L veya mL/L
D-glikoz	20.0 g
Amonyum nitrat (NH ₄ NO ₃)	5.0 g
Sodyum fitat	4.0 g
Kalsiyum klorür (CaCl ₂)	2.0 g
Potasyum klorür (KCl)	0.5 g
Magnezyum sülfat (MgSO ₄ (7H ₂ O))	0.5 g
Demir sülfat (FeSO ₄ (7H ₂ O))	0.01 g
Mangan sülfat MnSO ₄ (7H ₂ O))	0.01 g
Agar	14.0 g
Distile su	1000 mL

3.1.1.15 Tribütrinli agar

Besiyeri Lipaz aktivitesinin var/yok tespiti için kullanılmıştır.

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra 1.5 atm basınçta 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Otoklavlandıktan sonra 60 °C’ye soğutulan besiyerine %1 oranında tribütrin eklenmiştir. Besiyeri içeriği Tablo 3.13’te gösterilmektedir.

Tablo 3.13

Tribütrinli Agar Besiyeri İçeriği

Malzeme	g/L veya mL/L
Maya ekstraktı	3.0 g
Bakteriyolojik pepton	5.0 g
Agar	14.0 g
Distile su	1000 mL

3.1.1.16 MRS broth %0.03 safra tuzu ilaveli

İçeriği Tablo 3.1’de belirtilmiş olan MRS Broth ortamına %0.03 g olacak şekilde safra tuzu (Ox-Bile, Oxoid) eklenmiştir. Distile suda çözülen besiyeri içeriği 1.5 atm basınçta 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.1.17 MRS broth %0.1 safra tuzu ilaveli

İçeriği Tablo 3.1’de belirtilmiş olan MRS Broth ortamına %0.1 g olacak şekilde safra tuzu (Ox-Bile, Oxoid) eklenmiştir. Distile suda çözülen besiyeri içeriği 1.5 atm basınçta 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.1.18 MRS broth %0.3 safra tuzu ilaveli

İçeriği Tablo 3.1’de belirtilmiş olan MRS Broth ortamına %0.3 g olacak şekilde safra tuzu (Ox-Bile, Oxoid) eklenmiştir. Distile suda çözülen besiyeri içeriği 1.5 atm basınçta 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.1.19 MRS broth %0.6 safra tuzu ilaveli

İçeriği Tablo 3.1’de belirtilmiş olan MRS Broth ortamına %0.6 g olacak şekilde safra tuzu (Ox-Bile, Oxoid) eklenmiştir. Distile suda çözölen besiyeri içeriği 1.5 atm basınçta 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.1.20 pH 2 ve pH 3 MRS broth ortamı

İçeriği Tablo 3.1’de belirtilmiş olan MRS Broth (Merck) distile suda çözüldükten sonra arzu edilen pH seviyesine ulaşıncaya kadar içeriğine 1 M hidroklorik asit (HCl) yavaş bir şekilde eklenmiş ve 1.5 atm basınçta 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.2 Standart bakteri suşları

Süreç boyunca kullanılan standart bakteri suşları Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakölte, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı’nda bulunan koleksiyondan sağlanmıştır. Gliserol içeriğinde -80°C’de stok halinde bulunan bakteriler Nutrient Broth besiyeri içeriğinde, 37 °C’de 24 saatlik inkübasyon sonucunda aktiflenmiş ve çalışmalarda kullanılmıştır. Standart bakteri suşları Tablo 3.14’te gösterilmektedir.

Tablo 3.14

Kullanılan Standart Bakteri Suşları

Tür Adı	ATCC Kod Numarası
<i>Basillus cereus</i>	ATCC 11778
<i>Escherichia coli</i> 35218	ATCC 35218
<i>Escherichia coli</i> 25922	ATCC 25922
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 51299
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC B-4420
<i>Lactobacillus plantarum</i>	ATCC 14917
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	ATCC 29521

Tablo 3.14 (Devam) Kullanılan Standart Bakteri Suşları

<i>Akkermansia muciniphila</i>	ATCC BAA-835
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 208288
<i>Lactobacillus reuteri</i>	ATCC 23272
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC 7469
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 393

3.1.3 Kullanılan araç ve gereçler

Kullanılan tüpler, şişeler, falkonlar, sıvılar, rezervuarlar ve diğer tüm gereçlerin uygun olanları alüminyum folyo ile belli bir şekilde sarılarak otoklavda 121 °C, 1.5 atm basınçta 15 dakika steril edilmiştir. Kullanılan araç ve gereçler markalarıyla beraber Tablo 3.15’te gösterilmektedir.

Tablo 3.15

Kullanılan Araç ve Gereçler ile Markaları

Araç/ Gereç	Marka
Laminer flow kabini	Heal Force, Çin
Otoklav	Hirayama, Japonya
Vorteks	Daihan, Güney Kore
McFarland	Biosan, Letonya
Cryo tüp (2 mL)	Tarsons, Hindistan
Petri kabı	Isolab, Almanya
96 kuyucuklu plaka	TPP, İsviçre
24 kuyucuklu plaka	Isolab, Almanya
0.22 ve 0.45 µm şırınga tipi steril filtre	Isolab, Almanya
Pastör pipeti	Isolab, Almanya
Şarjlı pipetör	Starlab, Almanya
10, 100, 1000 ve 5000 µL’lik otomatik pipet	Eppendorf, Almanya
10, 200, 1000 µL’lik mikropipet ucu	Greiner bio-one, ABD

Tablo 3.15 (Devam) Kullanılan Araç ve Gereçler ile Markaları	
12 kanallı otomatik pipet	Thermo, ABD
Parafilm	Pechiney, Fransa
15 ve 50 mL'lik santrifüj tüpleri	Isolab, Almanya
Masaüstü soğutmalı santrifüj	Hettich, Almanya
Derin dondurucu buzdolabı	Arçelik, Türkiye
Inverted mikroskop	Leica, Almanya
Lam	Isolab, Almanya
Hassas terazi	Ohaus, Avustralya
Cytation 3 mikropilaka okuyucu	Bio-Tek, ABD
Spektrofotometre	Shimadzu, Çin

3.1.4 Kullanılan kimyasallar, çözeltiler ve boyalar

3.1.4.1 %20'lik gliserol çözeltisi

Test bakterilerinin ve izolatların -80 °C'de stoklanmasında kullanılan %20'lik gliserol çözeltisi; 20 mL gliserol ile 80 mL distile su çözüldükten sonra 121 °C, 1.5 atm basınçta 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.4.2 %0.9'luk fizyolojik tuzlu su

Mikrobiyolojide fizyolojik tuzlu su ekimlerde dilüsyon sıvısı olarak kullanılmaktadır. 100 mL distile su içerisinde 0.9 g sodyum klorür (NaCl) çözülmüştür. 121 °C, 1.5 atmosfer basınçta, 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.4.3 %3'lük Hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltisi

Saf hidrojen peroksit (%35) 0.1 mL alınıp 30 mL'ye distile su eklenerek tamamlanmıştır. Sonrasında bu çözeltiden 1 mL farklı bir erlene alınıp distile su ile 30 mL'ye tamamlanmıştır.

3.1.4.4 0.1 M HCl çözeltisi ve 0.1 M NaOH çözeltisi

100 mL distile su içerisine 3.6 g Hidrojen klorür (HCl) çözülmüştür ve pH ayarlamasında kullanılmıştır.

100 mL distile su içerisinde 4.0 g Sodyum hidroksit (NaOH) eklenmiştir ve laktik asit üretim tayininde kullanılmıştır.

3.1.4.5 DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) çözeltisi

200 mL metanolde DPPH (Sigma) 10 mg tartılıp çözülmüştür. Kullanılacak deneyden önce taze olarak hazırlanmış olup çalışmada kullanım süresince karanlıkta saklanmıştır. Antioksidan aktivite deneyi için kullanılmıştır.

3.1.4.6 %0.01'lik Resazürin çözeltisi

Distile suda hazırlanan %0.01'lik Resazürin çözeltisi MİK deneyinde canlı hücre olup olmadığını belirlemek için kullanılmıştır.

3.1.4.7 Askorbik asit çözeltisi

Askorbik asit 2 µg/mL olacak şekilde hazırlanıp distile su içinde çözülmüştür ve antioksidan aktivite testinde kontrol olarak kullanılmıştır.

3.1.4.8 Kloramfenikol çözeltisi

Toz halindeki kloramfenikol 250 µg/mL olacak şekilde dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözülerek belirlenen konsantrasyonlarda ana stoğu hazırlanmıştır. Antimikrobiyal aktivite testlerinde kontrol olarak kullanılmıştır.

3.1.4.9 Gram boyama seti

Kristal viyole, lügol, alkol ve safraninden oluşan gram boyama seti (Norateks) bakterilerin tanımlanmasında kullanılmıştır.

3.1.4.10 Fenolftalein

Fenolftalein (Sigma), laktik asit üretim tayininde kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Kolostrum örneklerinin temini

Eskişehir ve Rize'den elde edilen inek kolostrumu ve keçi sütü probiyotik mikroorganizmaların izolasyonu için ana kaynak olarak kullanılmıştır.

3.2.2 Kolostrum örneklerinden mikroorganizma izolasyonu

Keçi sütü ve inek kolostrumu örnekleri 1, 1/2, 1/4 ve 1/8 olacak şekilde fizyolojik tuzlu su ile dilüe edilmiştir. Dilüe örneklerden 100 µL alınarak steril drigalski spatülü ile MRS agar ve M17 agar besiyerine yayma ekim yapılmış ve koşullarda 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda farklı morfolojideki kolonilerden steril öze yardımıyla tek bir koloni alınmış ve MRS agar ve M17 agar besiyerine tek koloni ekimi yapılmıştır. Petriler, koşullarda 37°C’de inkübasyona bırakılmış ve saf kültürler elde edilene kadar pasajlanmıştır.

3.2.3 İzole edilen mikroorganizmaların tanımlanması

İzole edilen mikroorganizmalara ilk olarak gram boyama testi ve katalaz testi uygulanmıştır. Gram pozitif (+) ve katalaz negatif (-) olan bakteriler seçilmiş ve çalışmalara bu bakterilerle devam edilmiştir.

3.2.3.1 Gram boyama testi

Gram boyama yöntemi, Danimarkalı patolog Christian Gram tarafından 1884’te geliştirilmiştir. Bu yöntem hücre duvarı ve zarı geçirgenliğine göre bakterileri Gram pozitif ve Gram negatif şeklinde ayırmaktadır (Beveridge, 2001).

Gram negatif bakteriler duvarları ince ve lipid açısından zengin özelliğe sahipken gram pozitif bakteriler kalın duvarlı ve lipid açısından fakirdirler (Thairu vd., 2014). Ayrıca Gram pozitif bakterilerde teikoik asit bulunur fakat gram negatiflerde bulunmamaktadır (Tunalı, 2021).

İstisnaları olmasına karşın genel olarak gram negatif bakteriler dış zar yapıları nedeniyle daha patojeniktir. Gram negatif bakterilerin dış zarlarında, endotoksin yapıda olan lipopolisakkarit (LPS) bulunur. Gram pozitif bakteriler LPS içermemesinden dolayı daha az patojeniktirler. Ayrıca gram pozitif bakteriler penisilin gibi beta-laktam antibiyotiklere karşı daha duyarlıdır (Thairu vd., 2014).

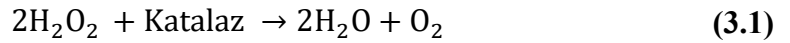
İzolatların gram boyamaları 24 saatlik taze kültürlerden yapılmıştır. İlk olarak lam üzerine birkaç damla distile su damlatılmış ve öze yardımıyla koloniler lam üzerine iyice yayılmıştır. Lam bek alevinden 1-2 defa geçirilerek fikse edilmiştir. Preparat üzerine ilk olarak kristal viyole damlatılmıştır. Bir dakika beklenmiş ve distile su ile iyice yıkanmıştır. Sonra lügol damlatılmış ve bir dakika daha beklendikten sonra yıkanmıştır.

Daha sonra lamın üzerine alkol damlatılıp 30 saniye beklenmiş, distile suda yıkanmıştır. Son olarak da lama safranin damlatılmış ve bir dakika bekletilip suyla yıkanmıştır. Kurutma kâğıdı ile fazla su lam üzerinden alınmıştır. Boyaması tamamlanan preparatların renk ve morfolojisi ışık mikroskopuyla incelenmiştir. Pembe renkte görünenler Gram negatif (-), mor renkte görünenler Gram pozitif (+) olarak değerlendirilmiştir (Tunalı, 2021).

3.2.3.2 Katalaz testi

Hidrojen peroksitin (H₂O₂) suya ve oksijene parçalandığı katalaz reaksiyonlarının önemi, Gram pozitif özellik gösteren bakterilerin tür veya cins düzeyinde ayırt edilmesi ve sınıflandırılmasını sağlamaktır. Örneğin; katalaz negatif olan streptokoklar ve *Diplococcus pneumoniae*, güçlü katalaz pozitif olan stafilokoklardan ve mikrokoklardan kolayca ayırt edilebilir (Welton I. Taylor ve David Achanzar, 1972).

Katalaz enzimi, hidrojen peroksitin bakterisit etkilerini nötralize etmeyi sağlamaktadır. Katalaz, hidrojen peroksitin suya ve oksijene parçalanmasını hızlandırmaktadır. Bu reaksiyon, kabarcıkların hızlı oluşumu ile belirgin olur. Hidrojen peroksitin katalaz ile girdiği reaksiyon aşağıda gösterilmiştir.



Pasteur pipeti yardımıyla lam üzerine bir damla %3 H₂O₂ damlatılmıştır. Tek koloni ekimi yapılarak elde edilen saf kolonilerden steril öze ile az miktarda organizma alınıp lama yerleştirilmiştir ve kabarcık oluşumu gözlemlenmiştir (O₂ + su = kabarcıklar). Kabarcık oluşumu katalaz (+) kabarcık oluşmaması ise katalaz (-) olarak değerlendirilmiştir. Test yapılırken pozitif kontrol olarak da *Staphylococcus aureus* bakterisi kullanılmıştır (Reiner K., 2010).

3.2.3.3 Hemolitik aktivite tayini

Bakteri suşlarının hemolitik aktivitelerinin belirlenmesi için besiyerinde 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kanlı agar besiyerine inkübasyon sonrasında izolatlardan tek koloni ekimi yapılmıştır. Kanlı agar içeren petrilere ekilen bakteriler 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda koloni çevresi parlak yeşil ise α-hemoliz, berrak ise β-hemoliz, herhangi bir zon oluşumu görünmüyorsa γ-hemoliz şeklinde

değerlendirilmiştir. Kontrol olarak hemolitik aktivitesi bilinen *E. coli* ATCC 25922 bakterisi kullanılmıştır (Jin vd., 2020).

3.2.4 LAB izolatlarının probiyotik özelliklerinin belirlenmesi

3.2.4.1 Asit direncinin belirlenmesi

Bakteri suşları MRS broth ortamında aktiflendikten sonra 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 1 M HCl ile pH 2 ve pH 3’e ayarlanmış sıvı MRS besiyerine ve kontrol olarak hazırlanan pH 7.2 ortamına gecelik kültürlerden %1’lik inokülasyon yapılmıştır. Hazırlanan süspansiyonlardan 0, 1, 2 ve 4. saatlerde tek kullanımlık öze ile bir öze dolusu alınarak MRS agar ortamına ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriler 24-48 saat 37°C’de inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda üreme olup olmadığı gözlemlenmiştir (Pereira & Gibson, 2002).

3.2.4.2 Safra tuzu direncinin belirlenmesi

Safra tuzuna karşı direnci belirlemek amacıyla izolatlar 2 kez sıvı MRS besiyerine %1’lik ekim yapılmıştır ve 48 saat 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından %0.03, %0.1, %0.3 ve %0.6 oranında safra tuzu içeren sıvı MRS besiyerine %1’lik ekim yapılmıştır. Kontrol olarak da sıvı MRS besiyerine ekim yapılmıştır. Hazırlanan süspansiyonlardan besiyerlerinden 0, 1, 2 ve 4. saatlerde steril öze yardımıyla bir öze dolusu MRS agar ortamına ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriler 48 saat 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda üreme olup olmadığı değerlendirilmiştir (Pan vd., 2009).

3.2.4.3 Antimikrobiyal aktivite tayini

Agar kuyucuk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri antimikrobiyal aktivite tayini için kullanılan yöntemlerdir. Deneylerde kullanılan test bakterileri; *B. cereus* ATCC 11778, *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 51299, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. typhimurium* ATCC B-4420, *S. aureus* ATCC 25923’ dir.

LAB izolatları; sıvı MRS besiyerine ortamına ekim yapılarak 37°C’de 18-24 saat inkübe edilmiş ve aktif kültürler oluşturulmuştur. Bu kültürlerden tekrar sıvı MRS besiyerine

%1'lik ekim yapılarak 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Aktif kültürler antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılmıştır.

MRS agar ortamında geliştirilen LAB'lardan steril öze yardımıyla tek koloni alınarak sıvı MRS besiyerine inoküle edilmiş ve 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 15 dakika 9000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatant 0.22 µm por çaplı şırınga tipi filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Filtreden geçirilen süpernatantlarda mikroorganizma varlığının kontrolü için MRS agar içeren petrilere ekim yapılmıştır (Banakar vd., 2023).

Bölüm 3.2.6'da bahsedildiği gibi elde edilen modifiye besiyerlerinden yukarıda detaylı bir şekilde anlatılan yöntemle fermentasyon sıvıları ayrılmıştır. İlk olarak agar kuyucuk difüzyon yöntemi kullanılmış ve aktivite gözlenen patojenler modifiye besiyerlerinin aktivitesini belirlemek için seçilmiştir. Bu patojenlerle bakterileriyle %5 ve %10 oranındaki modifiye besiyerlerinden elde edilen fermentasyon sıvıları ile agar kuyucuk difüzyon yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre aktivite gözlenen petriler, mikrodilüsyon yöntemi ile değerlendirilmiştir.

3.2.4.3.1 Agar kuyucuk difüzyon metodu

Test bakterileri Nutrient Broth ortamına gecelik kültür oluşturmak için ekilmiş ve 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Aktif test bakterileri inkübasyonun ardından %0.9'luk fizyolojik tuzlu su ile McFarland 0.5 bulanıklığına ayarlanmıştır. Steril petrilere hazırlanan MHA besiyerine bulanıklığı ayarlanan test bakterilerinden 100 µL alınarak steril drigalski spatülü ile yayma ekim yöntemiyle ekim yapılmıştır. Hazırlanan besiyerlerine 3 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. Steril fermentasyon sıvılarından yani postbiyotiklerden ve 250 µg/mL olarak hazırlanan kloramfenikolden 80 µL alınarak kuyucuklara konulmuştur. Petriler kabinde ön inkübasyon için bir saat bekletmiştir ve daha sonra 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda oluşan zon çapları cetvelle ölçülüp not edilmiştir (Tunalı, 2021).

3.2.4.3.2 Mikrodilüsyon metodu

Test bakterileri Nutrient Broth ortamına gecelik kültür oluşturmak için ekilmiş ve 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Aktif test bakterileri inkübasyonun ardından %0.9'luk fizyolojik tuzlu su ile McFarland 0.5 bulanıklığına ayarlanmıştır. MHB ortamında %0.9'luk fizyolojik tuzlu su içerisinde McFarland 0.5 bulanıklığına

ayarlanmış olan test bakterilerinden 1/100 oranında dilüe edilerek kullanılmıştır. Bu şekilde hazırlanan her bir bakteri ‘U’ tabanlı 96 kuyucuklu plakalara 100 µL dağıtılmıştır. Postbiyotiklerden de belirli kuyucuklara 100 µL konulmuş ve 1/4-1/64 aralığında seri dilüsyonlar oluşturulmuştur. Pozitif kontrol olarak 250 µg/mL olarak hazırlanan kloramfenikolden 100 µL kuyucuğa konulmuş ve seri dilüsyonlar yapılmıştır. Negatif kontrol olarak ise plakta madde içermeyen sadece test bakterisi bulunan kuyucuklar kullanılmıştır. Plakalar 37°C’de 18-24 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyonun ardından 30 µL resazürin çözeltisi (%0.01) ilave edilmiştir. Bu şekilde 2-4 saat daha 37°C’de inkübe edildikten sonra üreme olup olmadığı gözlemlenmiş ve üremenin olmadığı son kuyucuk Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) olarak belirlenmiştir (NCCLS, 2012).

Antimikrobiyal aktivitenin % inhibisyon olarak hesaplanması için ilk olarak test mikroorganizmaları bir gece önceden Nutrient Broth’da aktiflenmiştir. Aktiflenen test mikroorganizmaları McFarland 0.5’e ayarlanmıştır. 24 kuyucuklu plakalarda postbiyotik oranı %25 olacak şekilde kullanılmıştır. Bulanıklığı ayarlanan test mikroorganizmaları inoküle edilerek 37°C’de 18-24 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon süresi sonunda 600 nm’de ELISA’da absorbansları ölçülmüştür. Çıkan sonuçlar aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$\% \text{ Antimikrobiyal aktivite} = \frac{A_{\text{kontrol}} - (A_{\text{örnek}} - A_{\text{postbiyotik}})}{A_{\text{kontrol}}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.2.4.4 Antioksidan aktivitenin belirlenmesi

Aktivitenin belirlenmesinde ‘U’ tabanlı 96 kuyucuklu plaka kullanılmıştır. İlk olarak belirlenen kuyucuklara 50 µL postbiyotik sıvılarından konulmuştur. Sonra her kuyucuğa 250 µL DPPH çözeltisi eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak 2 µg/mL konsantrasyonda askorbik asit kullanılmıştır. Plaklar 30 dakika, karanlıkta, oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 517 nm dalga boyunda ELISA cihazında absorbansları ölçülmüştür ve antioksidan aktiviteleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Alam vd., 2013).

$$\% \text{ İnhibasyon} = \frac{\text{Kontrol Absorbansı} - \text{Örneğin Absorbansı}}{\text{Kontrol Absorbansı}} \times 100 \quad (3.3)$$

3.2.5 Moleküler identifikasyon

Moleküler identifikasyon çalışmaları için BM Yazılım Danışmanlık ve Laboratuvar Sistemleri Şirketi, Ankara'dan hizmet alımı yapılmıştır.

Bakteri izolatlarının 16S rRNA gen dizilimi gibi evrensel bakteriyel primerler kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen çift yönlü DNA dizi analiz sonuçları hizalama işleminden sonra BLAST analizi yapılarak NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)'da tür tanımlaması gerçekleştirilmiştir.

Seçilen izolatın tanımlanması amacıyla 16s rRNA dizi analizi yapılmıştır. Bu amaçla sıvı besiyerinde hazırlanan gecelik kültür kullanılmıştır. İzolatın DNA izolasyonu için EurX GeneMATRIX Bacterial & Yeast DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. Elde edilen DNA'nın saflık ve miktar analizleri için Thermo Scientific Nanodrop 2000 spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. 8 F ve 1387 R primeleri (Universal primerler) ile tür tayini için hedeflenen gen bölgeleri PCR kullanılarak çoğaltılmıştır. Bakteri izolasyon protokolü aşağıdaki gibidir.

3.2.5.1 Bakteri DNA izolasyon protokolü

1- 1,5 mL ependorf tüpte A ve B karıştırılır.

A- 100 µL 1 gece inkübe edilmiş bakteriyel kültür ve 200 µL Lyse BG buffer

B- Petriden bakteriyel koloni alınarak 300 µL LYSE BG içerisinde süspanse edilir.

C- 0.1-1.5 mL 1 gece inkübe edilen bakteriyel kültür santrifüj edilir ve oluşan pellet 300 µL Lyse BG bufferda süspanse edilir.

2- 50 µL BL ve 2 µL RNaz A eklenir ve 3 dakika karıştırılır (pipetaj veya vorteks).

3- 37 C'de 15 dakika inkübe edilir.

4- 15 µL Proteinaz K ilave edilir. Pipetaj yapılır ya da vorteks ile 3 dakika karıştırılır.

5- 55 C'de 30 dakika inkübe edilir.

6- 350 µL sol BG ilave edilir. Pipetaj yapılır ya da vorteks ile 3 dakika karıştırılır.

7- 55 C'de 30 dakika inkübe edilir.

8- Lizat 2 dakika 11.000 rpm'de santrifüj edilir ve süpernatant kısmından 600 µL DNA binding spin kolona aktarılır ve toplama tüpünün üstüne konulur.

9- 1 dakika 11.000 rpm’de santrifüj edilir. Toplama tüp boşaltılır ve spin-kolon tekrar toplama tüpüne konulur.

10- Kalan lizat spin-kolona ilave edilir ve 1 dakika 11.000 rpm’de santrifüj edilir. Toplama tüp atılır ve spin kolon yeni bir collection tüpün üstüne konulur.

11- 450 µL Wash BGX buffer eklenir ve 11.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir.

12- Toplama tüpteki sıvı boşaltılır ve spin-kolon tekrar toplama tüpün üstüne konur.

13- 450 µL Wash BGX buffer eklenir ve 11.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir.

14- Toplama tüpteki sıvı boşaltılır ve spin-kolon tekrar toplama tüpün üstüne konur.

15- Wash BGX bufferı tamamen uzaklaştırmak için tekrar 11.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir.

16- Spin- kolon yeni temiz bir tüpe alınır (1,5-2 mL) ve 50-100 µL elüsyon buffer eklenir.

17- 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.

18- 1 dakika 11.000 rpm’de santrifüj edilir.

19- Spin-kolon atılır ve tüp daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere 2-8 °C’de veya -20 °C’de saklanır.

Elde edilen genomik DNA, kalıp DNA olarak kullanılarak 16S rRNA gen bölgesi için PCR kurulmuştur. Bu amaçla 8F=AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ve 1387R=GGGCGG WGTGTACAAGGC evrensel primerleri kullanılmıştır. Reaksiyon bileşenleri olarak, 10X TaqBuffer (+KCl-MgCl₂), 2.5 µL; 25 mM MgCl₂, 2.5 µL; 2.5 mM dNTP mix, 2.5 µL; 2.5 mM 27F primer, 2.5 µL; 2,5 mM 1492R primer 2.5 µL; Taq polimeraz 0,25 µL; nükleaz içermeyen distile su, 11,75 µL; kalıp DNA,1 µL kullanılmıştır. PCR işleminde, ön denatürasyon basamağı 94°C’de 3 dakika; denatürasyon basamağı 94°C’de 30 saniye, bağlanma basamağı 55°C’de 1 dakika, uzama basamağı 72°C’de 2 dakika, 35 döngü; son uzama basamağı ise 72°C’de 5 dakika olarak yapılmıştır.

Ön denatürasyon basamağı 94°C’de 3 dakika; denatürasyon basamağı 94°C’de 30 saniye, bağlanma basamağı 55°C’de 1 dakika, uzama basamağı 72°C’de 2 dakika, 35 döngü; son uzama basamağı ise 72°C’de 5 dakika olarak yapılmıştır.

Sanger dizileme ile elde edilen okumalar, bir konsensüs dizi oluşturmak amacıyla kontig haline getirilmiştir. Bu işlemin gerçekleştirilmesinde BioEdit yazılımı içinde CAP contig

assembly algoritması kullanılmıştır. Diziler NCBI (National Center for Biotechnology Information) üzerinden eşleştirilerek en yakın tür belirlenmiştir.

3.2.6 Prebiyotiklerin hazırlanması

Yer elması, şeker pancarı küspesi ve buğday kepeği lokal satıcılardan temin edilmiştir. Yer elması önce yüzeyine yapışmış tozları gidermek amacıyla su ile yıkanmış ve ardından ince şekilde rendelenmiştir. Rendelendikten sonra 45 °C’de 24-48 saatte kurutulmuştur. Kurutulan malzeme bir öğütücüde öğütülmüş ve geniş ağızlı yuvarlak şişelerde saklanmıştır. Şeker pancarı küspesi için de yine aynı yöntem uygulanmıştır (Ganaie vd., 2017).

Saccaromyces cerevisiae’nin prebiyotik olarak kullanılması için öncelikle maya izolatı SDA besiyerinde aktiflenmiştir. Aktiflenen maya izolatından sıvı besiyerlerine inoküle edilmiş ve biyokütle artışı sağlamak amacıyla 48 saat inkübe edilmiştir. Zarei ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmadaki protokol, modifiye edilerek kullanılmıştır. İnkübasyondan sonra besiyerleri 121°C’de 15 dakika otoklavlanmış ve ardından 9000 rpm’de 30 dakika santrifüj edilmiştir ardından 0,45 µm por çaplı tek kullanımlık şırınga tipi filtreden geçirilmiştir. Sonra tekrar 9000 rpm’de 30 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen pellet üzeri parafilm ile kapatılarak 45 °C’de etüvde kurumaya bırakılmıştır (Zarei vd., 2016).

Modifiye besiyerlerinin hazırlanmasında, Iraporda ve arkadaşları tarafından belirlenen yöntemin modifikasyonu kullanılmıştır. Toz haline getirilen prebiyotiklerden MRS besiyerinin içerisine MRS besiyerinin yerine geçecek şekilde hacimce %5 ve %10 oranlarında eklenmiştir. Bu şekilde hazırlanan her modifiye besiyerine izolasyonu yapılan bakterilerle birlikte; *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917, *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521, *Akkermansia muciniphila* ATCC BAA-835, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 208288, *Lactobacillus reuteri* ATCC 23272, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, *Lactobacillus casei* ATCC 393 standart suşlarından da %1’lik ekim yapılmıştır. Her modifiye besiyerine ekilen bakterinin büyüme eğrisini belirlemek için inkübasyonun 48.saatine kadar her iki saatte bir spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda biyokütle tayini için besiyeri santrifüj edilmiş, süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet 45 °C’lik etüvde kurutmaya bırakılmıştır (Iraporda vd., 2019).

3.2.7 Bakterilerin enzim taramaları

Ticari suşlar ile izole edilen bakterilerin lipaz, amilaz, proteaz ve fitaz enzimlerinin taramaları yapılmıştır. Taramalar tüm enzimler için petri yöntemleri ile bakılmıştır. Ayrıca Lipaz (MAK046-Sigma), proteaz (539125-Sigma) ve fitaz (KPhytase-Megazyme) enzimleri için kit prosedürleri uygulanmıştır. Bu kitler ticari suşlar ve izolatların MRS fermentasyon sıvıları ile biyokütle açısından en iyi sonuç veren modifiye besiyerlerinin fermentasyon sıvılarına uygulanmıştır.

3.2.7.1 Lipaz aktivitesinin tespiti

Lipaz aktivitesinin tayini için tribütrin agar kullanılmıştır. Hazırlanan besiyeri otoklavlanıp 60°C'ye soğutulmuş ve %0.1 oranında tribütrin eklenmiştir. Tribütrin agar besiyeri içeren petrilere nokta ekim yapılmış ve 37°C'de 24-48 saat boyunca inkübe edilmiştir (Keskin, 2019).

3.2.7.2 Amilaz aktivitesinin tespiti

Amilaz enzimin varlığını tespit etmek için nişastalı agar kullanılmıştır. Bakteriye izolatlar nişastalı agar ortamına ekilip 24-48 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra iyot çözeltisi damlalık yardımı ile petrilere damlatılmıştır. Bakteri bulunan bölgede beyazlaşma görülmesi halinde amilaz enzimin bakteride bulunduğu şeklinde ifade edilmiştir (Ekka & Namdeo, 2018).

3.2.7.3 Proteaz aktivitesinin tespiti

Proteaz enzimin tespiti için yağsız süt tozu içeren agar'lı besiyeri kullanılmıştır. Agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile proteaz aktivitesinin belirlenmesi için %1 oranında hazırlanan yağsız süt tozu içeren agar'lı besiyeri petrilere döküldükten sonra, besiyerlerine 3 mm çapında kuyucuk açılmıştır. Bakterilerin süspansiyonlarından kuyucuklara 60 µL konulmuştur. Petriler kabinde ön inkübasyon için bir saat bekletmiştir ve daha sonra 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda yağsız süt tozu içeren agar'lı besiyeri üzerinde saydam-beyaz bir zon bölgesi oluşması aktivitenin var olduğunu göstermektedir (Vijayaraghavan P & Vincent S, 2013).

3.2.7.4 Fitaz aktivitesinin tespiti

Fitaz enzimin varlığını tespit etmek için sodyum fitat'lı besiyeri kullanılmıştır. Ticari suşlar ile izole edilen bakteriler sodyum fitat'lı besiyerine nokta ekim tekniği ile inokule edilmiştir. İnokule edilen suşlar 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında koloni etrafında oluşan şeffaf zon oluşumu incelenmiştir. Zon oluşumu gözlenen mikroorganizmalar fitaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Erkan, 2014).

3.2.8 Fermentasyon sıvılarının organik asit tayini

Ticari suşlar ve izolatların MRS fermentasyon sıvıları ile biyokütle açısından en iyi sonuç veren modifiye besiyerlerinin fermentasyon sıvılarının organik asit tayini; laktik asit (K-LATE-Megazyme), asetik asit (K-ACETRM-Megazyme), bütirik asit (K-HDBA-Megazyme) kit prosedürlerine göre yapılmıştır. Laktik asit üretim tayini için ayrıca titrasyon deneyi yapılmıştır.

3.2.8.1 Laktik asit üretim tayini

Laktik asit miktarı titrasyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntemde ticari suşlar ve izolatların MRS broth ortamına ekimi yapılarak 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra tekrar MRS broth ortamına %1'lik ekim yapılmış ve tekrar inkübasyona bırakılmıştır. İkinci inkübasyondan sonra aktif kültürlerden 1 mL alınıp erlene konulmuştur ve 99 mL distile su eklenip 100 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltinin üzerine iki üç damla fenolftalein damlatılmıştır. Daha sonra 0.1 M NaOH çözeltisi ile titre edilmiştir. Ayrıca bu yöntem fermentasyon sıvılarına da uygulanmıştır. Harcanan NaOH miktarları % hesabı için kaydedilmiştir. Hesaplamalar aşağıdaki denkleme göre yapılmıştır (Kırmacı, 2010).

$$\% \text{Laktik Asit} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times M_{\text{NaOH}} \times 0.09}{m} \times 100 \quad (3.4)$$

V: Harcanan NaOH miktarı (mL)

m: Kullanılan örnek miktarı (mL)

M: NaOH molaritesi

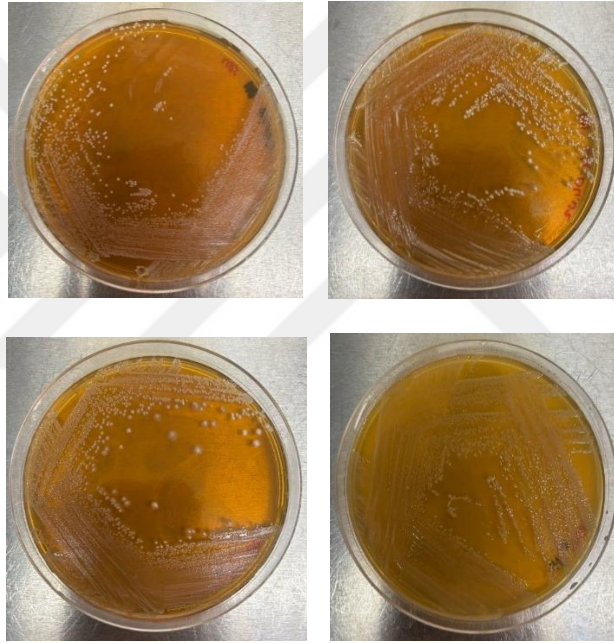
4 BULGULAR

4.1 Kolostrumdan Mikroorganizma İzolasyonu

Eskişehir ve Rize’den temin edilen inek kolostrumu ve keçi sütü probiyotik mikroorganizmaların izolasyonu için ana kaynak olarak kullanılmıştır. İzolasyonda kullanılan MRS ve M17 agar besiyerlerinde izole edilen mikroorganizmalardan gram boyama ve katalaz özelliğine göre 7 tanesi seçilmiştir. Görsel 4.1’de izole edilen mikroorganizmaların tek koloni çizgi ekim yapılmış petri görüntüleri bulunmaktadır.

Görsel 4.1

Kolostrumdan ve Keçi Sütünden İzole Edilen Mikroorganizma Örnekleri



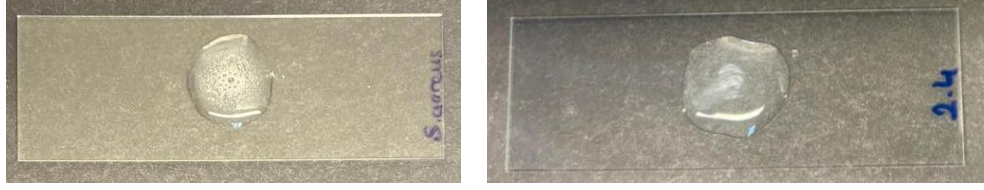
4.2 İzolatların Tanımlanması

4.2.1 Gram boyama ve katalaz testi sonuçları

İzolasyon sonrası elde edilen 20 izolatın 6 izolatın basil Gram pozitif (+) ve katalaz negatif (-), 1 izolatın kok Gram pozitif (+) ve katalaz negatif (-), 3 izolatın kok Gram pozitif (+) ve katalaz pozitif (+), 4 izolatın basil Gram negatif (-) ve katalaz (+) pozitif, 3 izolatın kokabasil Gram negatif (+) ve katalaz pozitif (+), 3 izolatın ise basil Gram negatif (-), katalaz negatif (-) olduğu tespit edilmiştir. Katalaz testi için pozitif kontrol olarak *S.aureus* bakterisi kullanılmıştır. Görsel 4.2, Görsel 4.3’te deney sonuç görselleri gösterilirken elde edilen veriler Tablo 4.1’de gösterilmektedir.

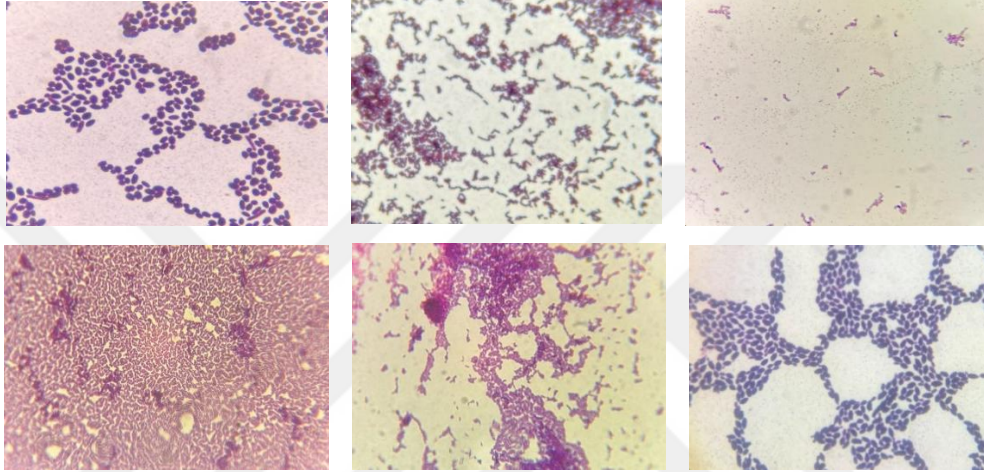
Görsel 4.2

Katalaz Pozitif (+) ve Negatif (-) Sonuç Örneği



Görsel 4.3

Saf Kültür İzolatlarının Gram Boyama Örnekleri



Tablo 4.1

İnek Kolostrumu ve Keçi Sütünden Elde Edilen İzolatların Kodları ve Özellikleri

Kod numarası	Gram özelliği	Katalaz özelliği	Morfoloji
M17 H1 *1	Pozitif	Pozitif	Kok
M17 H1 *2	Pozitif	Negatif	Kok
M17 H8 *1	Pozitif	Negatif	Basil
M17 H8 *2	Negatif	Pozitif	Basil
MRS H1-1	Negatif	Negatif	Basil
MRS H1-2	Pozitif	Pozitif	Kokobasil
MRS H1-3	Negatif	Negatif	Basil
MRS H1*1	Negatif	Pozitif	Basil
MRS H1*2	Negatif	Pozitif	Basil
MRS K *1	Pozitif	Pozitif	Kok

Tablo 4.1 (devam) Kolostrum ve Keçi Sütünden Elde Edilen İzolatların Kodları ve Özellikleri

MRS K *2	Pozitif	Pozitif	Kokobasil
MRS K-1	Pozitif	Pozitif	Kokobasil
MRS K-2	Pozitif	Pozitif	Kok
MRS H8-1	Pozitif	Negatif	Basil
MRS H8-2	Negatif	Negatif	Basil
MRS H8-3	Negatif	Pozitif	Basil
MRS 2.4	Pozitif	Negatif	Basil
MRS 1.3.1	Pozitif	Negatif	Basil
MRS 1.4.3	Pozitif	Negatif	Basil
MRS Lsp3	Pozitif	Negatif	Basil

4.3 İzole Edilen Mikroorganizmaların Probiyotik Özelliklerinin Değerlendirilmesi

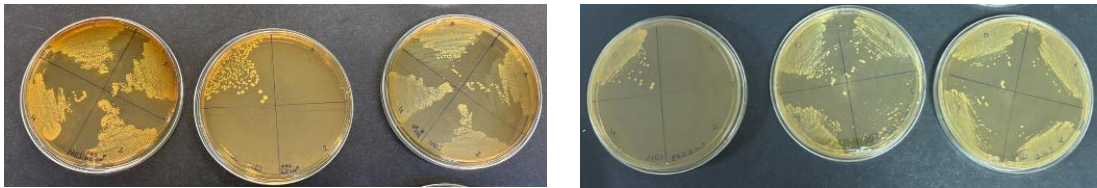
Saflaştırılan 7 izolatın probiyotik özelliklerini belirlemek için aşağıdaki deneyler yapılmıştır.

4.3.1 Asit direncinin belirlenmesi

Asit direncinin belirlenmesinde kullanılan pH'ı 2 olan besiyerinde izolatların hiçbirinde üreme gözlenmezken, pH'ı 3 olan besiyerinde 6 izolat üremiştir. Devam eden çalışmalarda bu 6 izolat kullanılmıştır.

Görsel 4.4

pH 2, pH 3 MRS Broth Asit Ortamında ve Kontrol Ortamı Olan pH 7 MRS Broth Ortamında İnkübe Edilen 7 Adet Saf Kültür İzolatlarının 0., 1., 2., 4. Saatlerde MRS Agarda Gelişimlerinin Petri Görüntüleri Örnekleri

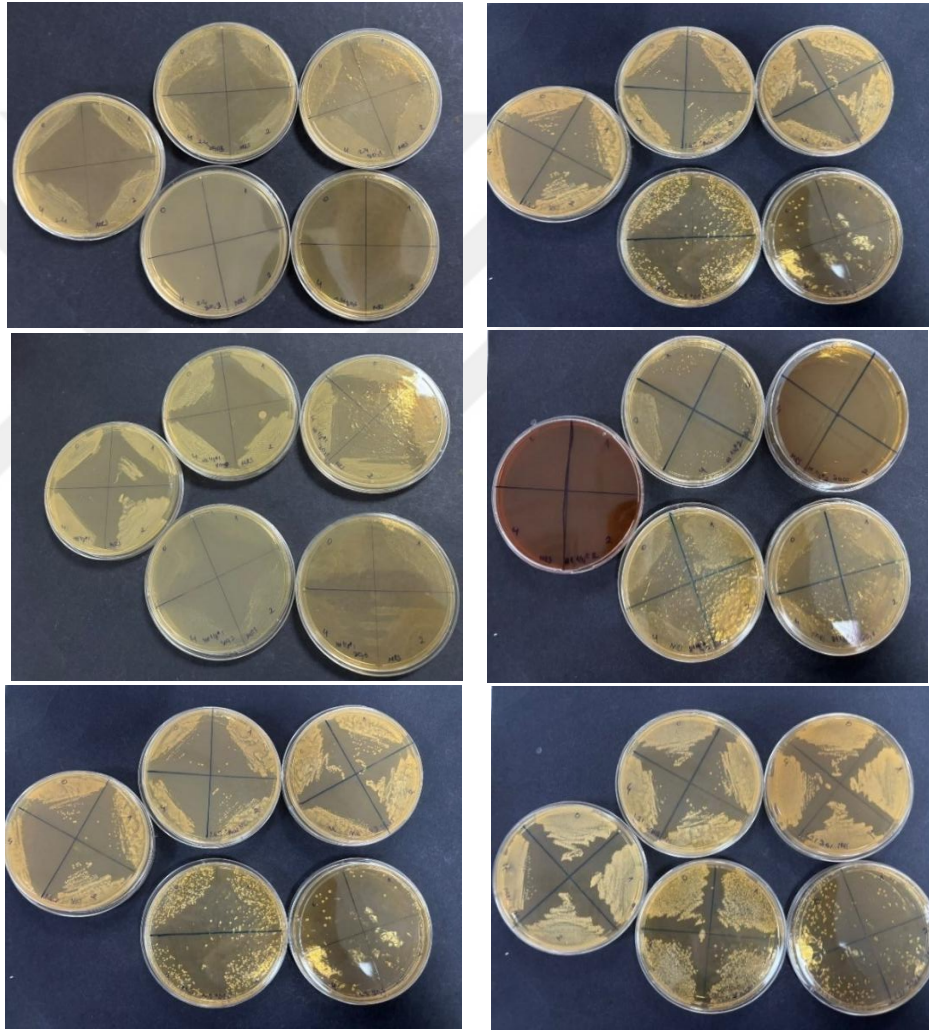


4.3.2 Safra tuzu direncinin belirlenmesi

Safra tuzu direncinin belirlenmesi amacıyla yapılan deneylerde 6 tane izolattan tümü %0.03, %0.1, %0.3 ve %0.6 safra tuzu içeren MRS broth ve kontrol besiyeri ortamında üreme göstermiştir. Görsel 4.5 ve görsel 4.6’da deney sonuçları gösterilmektedir.

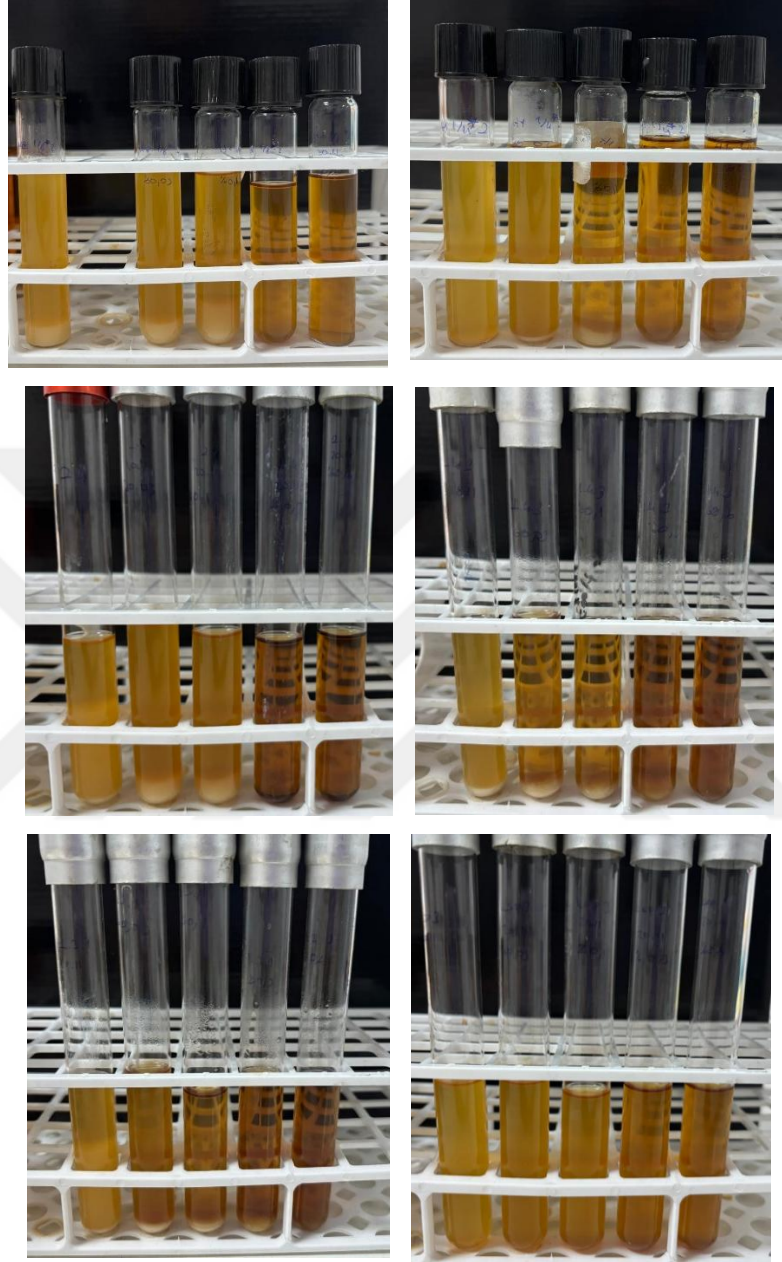
Görsel 4.5

Kontrol Ortamı Normal MRS Broth ve %0.03, %0.1 %0.3 ve %0.6 Safra Tuzu İçeren MRS Broth Ortamında İnkübe Edilen 6 Adet Saf Kültür İzolatlarının 0., 1., 2., 4. Saatlerde MRS Agarda Gelişimlerinin Petri Görüntüleri



Görsel 4.6

Kontrol Ortamı Normal MRS Broth ve %0.03, %0.1 %0.3 ve %0.6 Safra Tuzu İçeren MRS Broth Ortamında İnkübe Edilen 6 Adet Saf Kültür İzolatlarının Gelişimleri

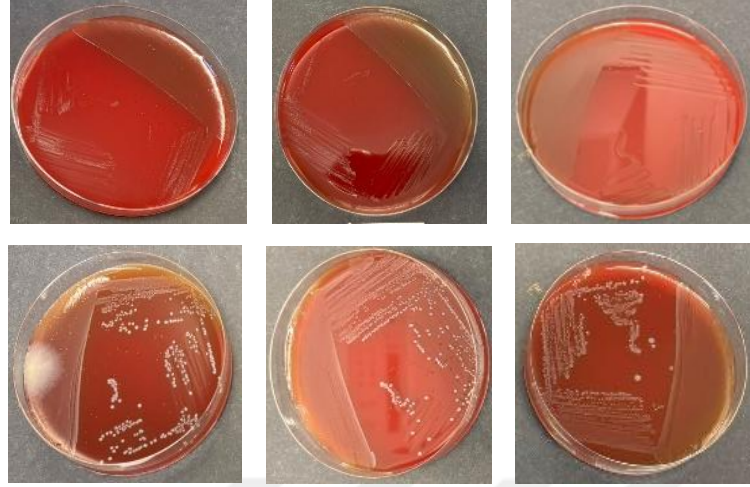


4.3.3 İzolatların hemolitik aktivite sonuçları

Kanlı agara ekilen bakteriler 37 °C’de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, izole edilen suşların hemolitik aktivitesi değerlendirilmiştir. Seçilen 6 tane izolattan tümü kanlı agarda zon oluşturmayarak γ - hemolitik özelliği göstermiştir.

Görsel 4.7

Saf Kültür İzolatlarının Hemolitik Aktivite γ -Hemolitik İzolatların Petri Görüntüsü



Bundan sonraki tüm çalışmalar, %5 ve %10 oranında eklenen farklı prebiyotiklerle kombine edilen besiyeri ortamında geliştirilen probiyotiklerin fermentasyon sıvıları ile devam etmiştir.

4.3.4 Antimikrobiyal aktivite tayini

4.3.4.1 Agar kuyucuk difüzyon metodu

Tablo 3.14'te belirtilen patojen bakteriler Nutrient Broth ortamına ekilmiş ve 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Aktiflenen bakterilerin McFarland 0.5 bulanıklığında süspansiyonları hazırlanmış ve MHA besiyerlerine 100 μ L yayma ekim yapılmıştır. MHA içeren agar plaklarına steril agar delici yardımıyla kuyucuklar açılmıştır. Açılan kuyucuklara 0.22 μ m por çaplı şırınga tipi filtreden geçirilen fermentasyon sıvılarından konulmuştur. Daha sonra 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda inhibisyon zon çapı ölçülmüştür.

İlk olarak tüm izolatların MRS besiyerinden elde edilen fermentasyon sıvılarının aktivitesi belirlenmiştir. Burada aktivite gözlenen test mikroorganizmaları belirlenerek, modifiye fermentasyon ortamlarının antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Kullanılan izolatların *B. cereus*, *E. coli* ATCC 25922, *L. monocytogenes* ve *S. typhimurium* 'a karşı aktivite göstermediği belirlenmiştir. Tablo 4.2'de ölçülen zon çapları verilmiştir.

Tablo 4.2*İzolatların Fermantasyon Sıvılarının Test Bakterileri Üzerinde Oluşturduğu Zon Çapları (mm)*

Test bakterileri	H8	H1	2.4	1.4.3	Lsp3	1.3.1	Kloramfenikol
<i>B. cereus</i>	0	0	0	0	0	0	14
<i>E. coli</i> 25922	0	0	0	0	0	0	16
<i>E. coli</i> 35218	4	3	3.5	5	3	3	10
<i>E. faecalis</i>	2	2	1	3	0	2	17
<i>L. monocytogenes</i>	0	0	0	0	0	0	19
<i>P. aeruginosa</i>	2	3	2	3	2	3	17
<i>S. aureus</i>	5	5	2	4	4	4	18
<i>S. typhimurium</i>	0	0	0	0	0	4	20

Modifiye besiyerlerinden elde edilen fermentasyon sıvıları ile probiyotik mikroorganizmaların agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile *P. aeruginosa*, *E. coli* ATCC 35218 ve *S. aureus* 'a karşı antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. Görsel 4.8'de *E. coli* ATCC 35218 ve *S. aureus* 'a karşı modifiye besiyerlerinden elde edilen postbiyotiklerin petri örnekleri görülmektedir. Elde edilen sonuçlar ise Tablo 4.3 ila 4.15 arasında gösterilmektedir.

H1 izolatının inülin ile modifiye edilen besiyerinde MRS'ye kıyasla *S. aureus* 'a karşı daha iyi zon yarıçapı elde edildiği görülmüştür. 2.4 izolatının inülin, *S.cerevisiae*, yer elması buğday kepeği modifiye besiyerlerinde *E. coli* ATCC 35218'e karşı; *P. aeruginosa* ve *S.aureus* 'da *S.cerevisiae* ile küspe modifiye besiyerlerinde MRS'ye göre daha iyi zon yarıçapı görülmüştür. Lsp3'te ise *E. coli* ATCC 35218'te MRS'ye kıyasla tüm modifiye besiyerlerinde daha iyi zon yarıçapı görülmüştür. *L.casei* 'de *S.aureus* 'da inülin yer elmasında daha iyi zon yarıçapları görülmüştür. *L.rhamnosus* 'da *E. coli* ATCC 35218'de MRS'ye kıyasla tüm modifiye besiyerlerinde daha iyi zon çapı görülmüştür. *S.aureus* 'da ise yer elması ve buğday kepeğinde daha iyi zon yarıçapı görülmüştür. *L. plantarum* 'da *E. coli* ATCC 35128'de modifiye besiyerlerinde tümünde daha iyi bir zon yarıçapı görülmüştür. *P.aeruginosa* 'da ise buğday kepeğinde daha iyi zon yarıçapı oluşmuştur. *S. aureus* 'da inülin hariç tümünde daha iyi zon çapları görülmüştür. *A. muciniphila* 'da MRS'ye kıyasla küspe de daha iyi zon görülmüştür. *S. cerevisiae* 'de *E. coli* ATCC 35218'de yer elmasında daha iyi, *P.aeruginosa* 'da ise MRS'ye kıyasla küspe hariç

tümünde daha iyi, *S.aureus*'da ise zonlar MRS'ye kıyasla tümünde daha iyidir. *B.bifidum* izolatu modifiye besiyerlerinde *P.aeruginosa*'da inülin ve yer elmasında daha iyi zonlar görülmüştür.

Tablo 4.3

H1 İzolatının Modifiye Besiyerlerindeki Fermantasyon Sıvılarının Test Bakterileri Üzerinde Oluşturduğu Zon Çapları (mm)

Test bakterileri	İnülin		<i>S. cerevisiae</i>		Ş. p. küspesi		Yer elması		Buğday kepeği		MRS
	%5	%10	%5	%10	%5	%10	%5	%10	%5	%10	
<i>E. coli</i> 35218	2	3	2	3.5	1.5	3	2.5	3	2.5	3	3
<i>P. aeruginosa</i>	3.5	4	2	2	1.5	2	2	3	2	2	3
<i>S. aureus</i>	3	3	2	2	3	3	4	3	4	4	5

Tablo 4.4

H8 İzolatının Modifiye Besiyerlerindeki Fermantasyon Sıvılarının Test Bakterileri Üzerinde Oluşturduğu Zon Çapları (mm)

Test bakterileri	İnülin		<i>S. cerevisiae</i>		Ş. p. küspesi		Yer elması		Buğday kepeği		MRS
	%5	%10	%5	%10	%5	%10	%5	%10	%5	%10	
<i>E. coli</i> 35218	3	3	3	2	3	2.5	2.5	2	2.5	2	4
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>S. aureus</i>	3	2	2	0	2	0	4	2	3	1	5

Tablo 4.5

1.4.3 İzolatının Modifiye Besiyerlerindeki Fermantasyon Sıvılarının Test Bakterileri Üzerinde Oluşturduğu Zon Çapları (mm)

Test bakterileri	İnülin		<i>S. cerevisiae</i>		Ş. p. küspesi		Yer elması		Buğday kepeği		MRS
	%5	%10	%5	%10	%5	%10	%5	%10	%5	%10	
<i>E. coli</i> 35218	2	3	2.5	3	3	4	2	3	2	3	5
<i>P. aeruginosa</i>	1	2	1	2	3	2	1	2	1.5	2.5	3
<i>S. aureus</i>	2.5	2	3	2	3	2	4	3	3	2.5	4

Tablo 4.6

1.3.1 İzolatının Modifiye Besiyerlerindeki Fermantasyon Sıvılarının Test Bakterileri Üzerinde Oluşturduğu Zon Çapları (mm)

Test bakterileri	İnülin		<i>S. cerevisiae</i>		Ş. p. küspesi		Yer elması		Buğday kepeği		MRS
	%5	%10	%5	%10	%5	%10	%5	%10	%5	%10	
<i>E. coli</i> 35218	3	3	4	4	3	3.5	3	3	3	3	3
<i>P. aeruginosa</i>	2	3	2	2	1.5	2	2	3	0	2	3
<i>S. aureus</i>	4	2	4	2	2	3	4	4	4	4	4

Tablo 4.7

2.4 İzolatının Modifiye Besiyerlerindeki Fermantasyon Sıvılarının Test Bakterileri Üzerinde Oluşturduğu Zon Çapları (mm)

Test bakterileri	İnülin		<i>S. cerevisiae</i>		Ş. p. küspesi		Yer elması		Buğday kepeği		MRS
	%5	%10	%5	%10	%5	%10	%5	%10	%5	%10	
<i>E. coli</i> 35218	3	4	4	4	3	3.5	4	4	3.5	4	3.5
<i>P. aeruginosa</i>	1.5	1.5	1	3	1	3	1.5	2	1	2	2
<i>S. aureus</i>	1	2	3	2	3	1	2	2	2	1	2

Tablo 4.8

Lsp3 İzolatının Modifiye Besiyerlerindeki Fermantasyon Sıvılarının Test Bakterileri Üzerinde Oluşturduğu Zon Çapları (mm)

Test bakterileri	İnülin		<i>S. cerevisiae</i>		Ş. p. küspesi		Yer elması		Buğday kepeği		MRS
	%5	%10	%5	%10	%5	%10	%5	%10	%5	%10	
<i>E. coli</i> 35218	2	3.5	3	3.5	3	3.5	4	4	3.5	4	3
<i>P. aeruginosa</i>	2	2	0	0	0	0	0	0	1	2	2
<i>S. aureus</i>	3	2	2	2	2	3	4	3	4	3	4

Tablo 4.9

L. casei İzolatının Modifiye Besiyerlerindeki Fermantasyon Sıvılarının Test Bakterileri Üzerinde Oluşturduğu Zon Çapları (mm)

Test bakterileri	İnülin		<i>S. cerevisiae</i>		Ş. p. küspesi		Yer elması		Buğday kepeği		MRS
	%5	%10	%5	%10	%5	%10	%5	%10	%5	%10	
<i>E. coli</i> 35218	3	3.5	3	3	4	4	3	4	2	2	4
<i>P. aeruginosa</i>	3	3	1	1.5	3	3	3	3	3	3	3
<i>S. aureus</i>	1	3.5	1	2	1	3	1.5	3.5	2.5	3	3

Tablo 4.10

L. reuteri İzolatının Modifiye Besiyerlerindeki Fermantasyon Sıvılarının Test Bakterileri Üzerinde Oluşturduğu Zon Çapları (mm)

Test bakterileri	İnülin		<i>S. cerevisiae</i>		Ş. p. küspesi		Yer elması		Buğday kepeği		MRS
	%5	%10	%5	%10	%5	%10	%5	%10	%5	%10	
<i>E. coli</i> 35218	3	3.5	1	2	1	3	3	3.5	3	4	4
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	2	2.5	2	1	2	3	2.5	2.5	3	3	3

Tablo 4.11

L. rhamnosus İzolatının Modifiye Besiyerlerindeki Fermantasyon Sıvılarının Test Bakterileri Üzerinde Oluşturduğu Zon Çapları (mm)

Test bakterileri	İnülin		<i>S. cerevisiae</i>		Ş. p. küspesi		Yer elması		Buğday kepeği		MRS
	%5	%10	%5	%10	%5	%10	%5	%10	%5	%10	
<i>E. coli</i> 35218	2	3	3	3	2	4	3.5	4	2	2.5	2.5
<i>P. aeruginosa</i>	2	3	1.5	2.5	2	2	2.5	3	2	3	3
<i>S. aureus</i>	1	1	1	1	0	0	1.5	2	1.5	1.5	1

Tablo 4.12

L. plantarum İzolatının Modifiye Besiyerlerindeki Fermantasyon Sıvılarının Test Bakterileri Üzerinde Oluşturduğu Zon Çapları (mm)

Test bakterileri	İnülin		<i>S. cerevisiae</i>		Ş. p. küspesi		Yer elması		Buğday kepeği		MRS
	%5	%10	%5	%10	%5	%10	%5	%10	%5	%10	
<i>E. coli</i> 35218	3.5	4	3	3.5	2	4	3	3.5	3	4	3
<i>P. aeruginosa</i>	1	2.5	3	3	2.5	3	3	3	3.5	3.5	3
<i>S. aureus</i>	0	0	1.5	1	1.5	1	1	2	2	2	1

Tablo 4.13

A. muciniphila İzolatının Modifiye Besiyerlerindeki Fermantasyon Sıvılarının Test Bakterileri Üzerinde Oluşturduğu Zon Çapları (mm)

Test bakterileri	İnülin		<i>S. cerevisiae</i>		Ş. p. küspesi		Yer elması		Buğday kepeği		MRS
	%5	%10	%5	%10	%5	%10	%5	%10	%5	%10	
<i>E. coli</i> 35218	2.5	2.5	3	3	3	3	3.5	3.5	3	3	3.5
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	1	1.5	1	1	1	2	1	1	1	1	1

Tablo 4.14

S. cerevisiae İzolatının Modifiye Besiyerlerindeki Fermantasyon Sıvılarının Test Bakterileri Üzerinde Oluşturduğu Zon Çapları (mm)

Test bakterileri	İnülin		<i>S. cerevisiae</i>		Ş. p. küspesi		Yer elması		Buğday kepeği		MRS
	%5	%10	%5	%10	%5	%10	%5	%10	%5	%10	
<i>E. coli</i> 35218	1	3	0	2	0	2	1	4	0	3	3.5
<i>P. aeruginosa</i>	2	3	2	3.5	1	2	2	3	2	3.5	2
<i>S. aureus</i>	0	2	0	1.5	0	2	0	2	0	2	1

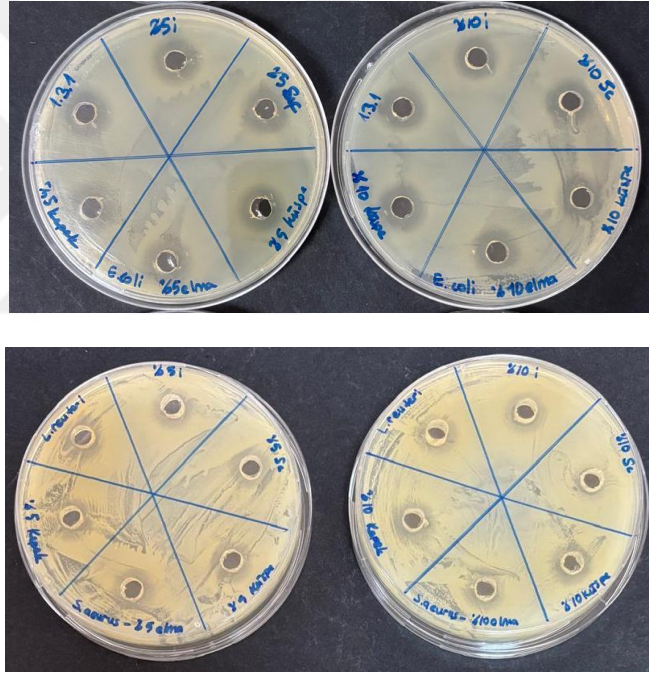
Tablo 4.15

B. bifidum İzolatının Modifiye Besiyerlerindeki Fermantasyon Sıvılarının Test Bakterileri Üzerinde Oluşturduğu Zon Çapları (mm)

Test bakterileri	İnülin		<i>S. cerevisiae</i>		Ş. p. küspesi		Yer elması		Buğday kepeği		MRS
	%5	%10	%5	%10	%5	%10	%5	%10	%5	%10	
<i>E. coli</i> 35218	2,5	4	3,5	3,5	4	4	4	5	3	3,5	4
<i>P. aeruginosa</i>	2	2,5	1	1	1	1	2	2,5	1,5	2	2
<i>S. aureus</i>	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2

Görsel 4.8

Modifiye Besiyerlerinden Elde Edilen Postbiyotiklerin Test Bakterilerine Karşı Aktivitesi



Genel olarak %5 ve %10 oranında modifiye edilen besiyerlerinde zon ölçümü açısından aralarında çok bir farklılık olmadığı görülmüştür. Farklılık olanlarda ise çoğunlukla %10 oranındakilerde daha iyi zon görülmüştür. En iyi zon *E. coli*'ye karşı *B. bifidum* %10 yer elmasında görülmüştür.

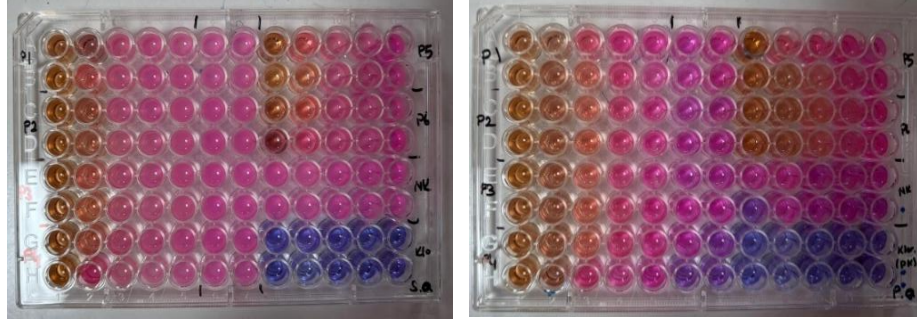
4.3.4.2 Mikrodilüsyon yöntemi

Probiyotiklerin antimikrobiyal aktivitesinde en düşük MİK değerleri *P. aeruginosa*'a karşı gözlenirken, en yüksek MİK değeri *S. aureus*'a karşı elde edilmiştir. Deneyin 96

kuyucuklu plaka görüntü örnekleri Görsel 4.9’da gösterilmektedir ayrıca MİK değerleri Tablo 4.16’da verilmiştir.

Görsel 4.9

Fermentasyon Sıvılarının Antimikrobiyal Aktivitesi



Tablo 4.16

Fermentasyon Sıvılarının MİK Değerleri

Test bakterileri	H8	H1	2.4	1.4.3	Lsp3	1.3.1	Kloramfenikol
<i>B. cereus</i>	1/4	1/4	1/4	1/4	1/8	1/8	>250 µL
<i>E. coli</i> 35218	1/4	1/4	1/4	1/4	1/8	1/8	>250 µL
<i>E. coli</i> 25922	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/16	>250 µL
<i>E. faecalis</i>	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	>250 µL
<i>L. monocytogenes</i>	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	>250 µL
<i>P. aeruginosa</i>	1/16	1/16	1/16	1/8	1/4	1/16	>250 µL
<i>S. aureus</i>	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	>250 µL
<i>S. typhimurium</i>	1/8	1/8	1/8	1/8	1/4	1/4	>250 µL

P. aeruginosa, *E. coli* ATCC 35218 ve *S. aureus* kullanılarak modifiye besiyerlerinin fermentasyon sıvılarıyla yapılan agar kuyucuk difüzyon sonuçlarına göre seçilen her bakteriden bir örnek ile % MİK değeri hesaplanmıştır. Bunlar H1’de *E. coli* 35218 için *S. cerevisiae* %10, *P. aeruginosa* için inülin %10, *S. aureus* için buğday kepeği %10; H8’de *E. coli* 35218 için şeker pancarı küspesi %5, *S. aureus* için yer elması %5; 1.4.3’te *E. coli* 35218 için şeker pancarı küspesi %10, *P. aeruginosa* için şeker pancarı küspesi %5, *S. aureus* için yer elması %5; 1.3.1’te *E. coli* 35218 için *S. cerevisiae* %10, *P. aeruginosa* için yer elması %10, *S. aureus* için buğday kepeği %10; 2.4’te *E. coli* 35218 için buğday kepeği %10, *P. aeruginosa* için *S. cerevisiae* %10, *S. aureus* için şeker pancarı küspesi %5; Lsp3’te *E. coli* 35218 için buğday kepeği %10, *P. aeruginosa* için inülin %5, *S. aureus* için yer elması %5; *L. casei*’de *E. coli* 35218 için yer elması %10, *P. aeruginosa* için buğday kepeği %10, *S. aureus* için yer elması %10; *L. reuteri*’de *E. coli* 35218 için

buğday kepeği %10, *S. aureus* için şeker pancarı küspesi %10; *L. rhamnosus*'ta *E. coli* 35218 için şeker pancarı küspesi %10, *P. aeruginosa* için buğday kepeği %10, *S. aureus* için yer elması %10; *L. plantarum*'da *E. coli* 35218 için şeker pancarı küspesi %10, *P. aeruginosa* için buğday kepeği %10, *S. aureus* için yer elması %10; *A. municipihila*'da *E. coli* 35218 için yer elması %5, *S. aureus* için şeker pancarı küspesi %10; *S. cerevisiae*'da *E. coli* 35218 için yer elması %10, *P. aeruginosa* için *S. cerevisiae* %10, *S. aureus* için buğday kepeği %10; *B. bifidum*'da 10 *E. coli* 35218 için yer elması %10, *P. aeruginosa* için inülin %10, *S. aureus* için şeker pancarı küspesi %5 kullanılmıştır.

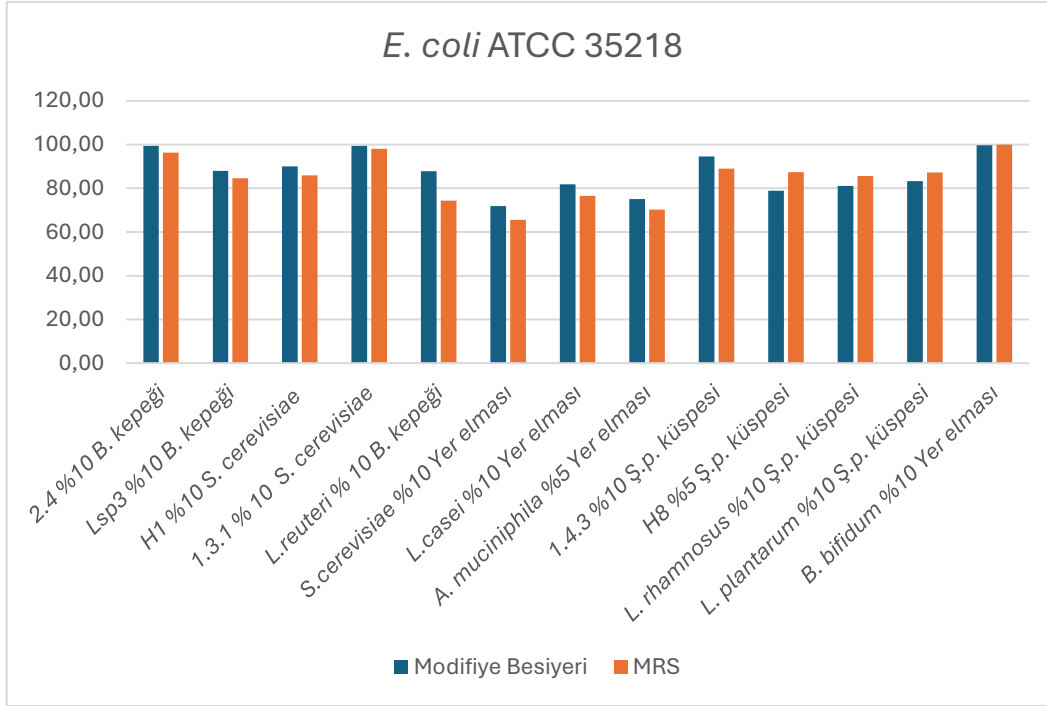
Agar kuyucuk difüzyon yöntemine göre en iyi aktivite görülen test patojenlerine karşı postbiyotiklerin yüzde antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.1'de gösterilmektedir.

% MİK değerini hesaplamada %25 oranında modifiye besiyeri kullanıldığında MRS'ye oranla daha iyi inhibe edenler: *E.coli* ATCC 35218'de *B. bifidum*, *S.cerevisiae* ve *L.casei* için %10 yer elması, 2.4 ve Lsp3 için %10 buğday kepeği, H1 ve 1.3.1 %10 *S.cerevisiae*, *L.reuteri* %10 B.kepeği, *A. municipihila* %5 yer elması, 1.4.3 %10 şeker pancarı küspesi; *S.aereus*'da H1 ve *S.cerevisiae* için %10 buğday kepeği, *L.reuteri*, *A. municipihila* %10 şeker pancarı küspesi, %10, *B. bifidum* %5 şeker pancarı küspesi; *Paeruginosa*'da *S.cerevisiae* ve 2.4 için %10 *S.cerevisiae*, Lsp3 %5 inülin, H1 %10 inülin, *L.casei* ve *L.plantarum* %10 buğday kepeği, 1.4.3 %5 buğday kepeği şeklinde sonuçlanmıştır.

Postbiyotiklerden %25 oranında kullanılarak yapılan MİK deneyinde genel olarak 2.4, *B.bifidum* ve 1.3.1'in yüksek oranlarda inhibe ettiği görülmüştür. MRS'sine kıyasla en iyi sonuçlar *E. coli* 35218'te *B. bifidum* %10 yer elması; *S. aereus*'ta *A. muciniphila* %10 şeker pancarı küspesi; *Paeruginosa*'da 2.4 %10 *S.cerevisiae*'da görülmüştür.

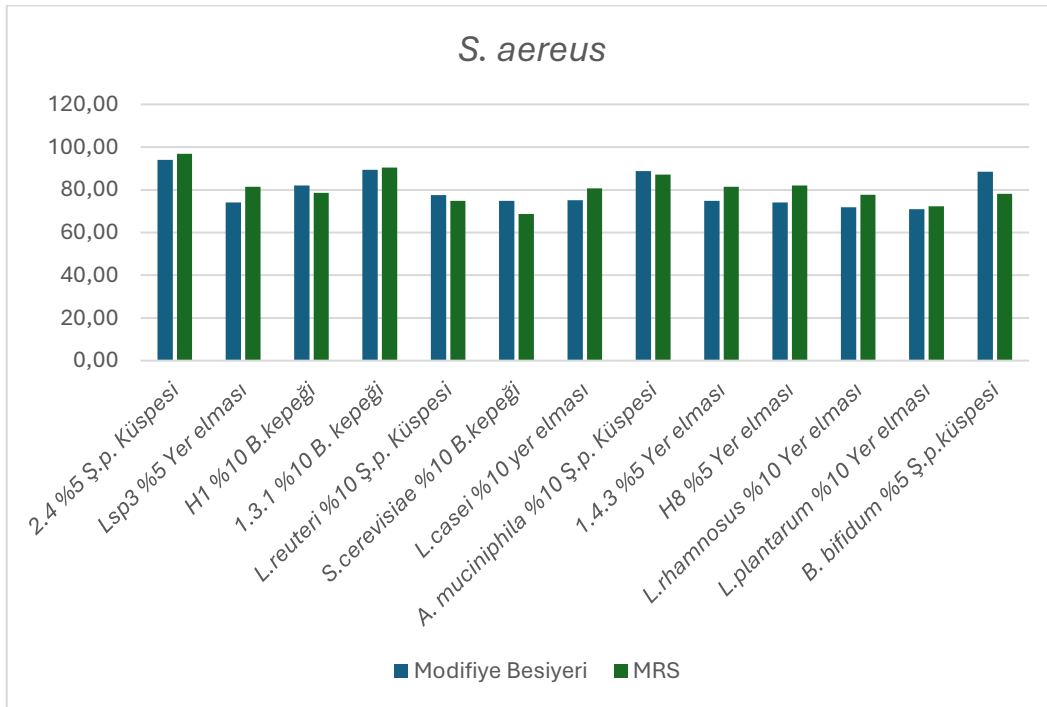
Şekil 4.1

İzolatların ve Ticari Suşların Seçilen Fermentasyon Sıvılarının E. coli ATCC 35218'e Karşı % MİK Değerleri



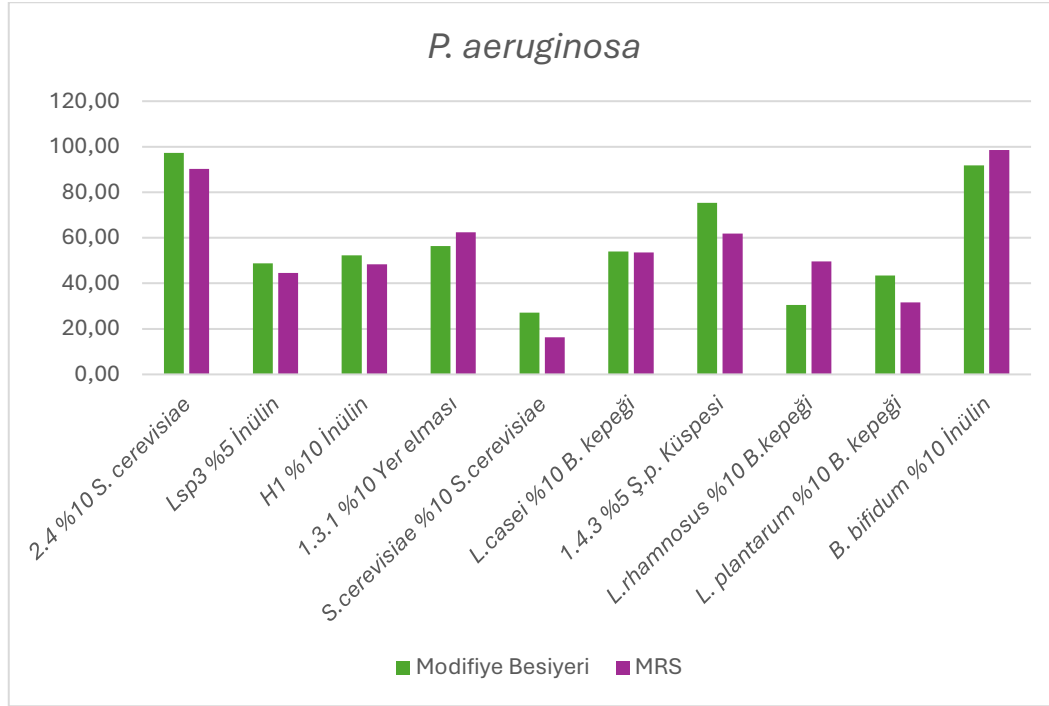
Şekil 4.2

İzolatların ve Ticari Suşların Seçilen Fermentasyon Sıvılarının S.aereus'a Karşı % MİK Değerleri



Şekil 4.3

İzolatların ve Ticari Suşların Seçilen Fermentasyon Sıvılarının P.aeruginosa'ya Karşı % MİK Değerleri



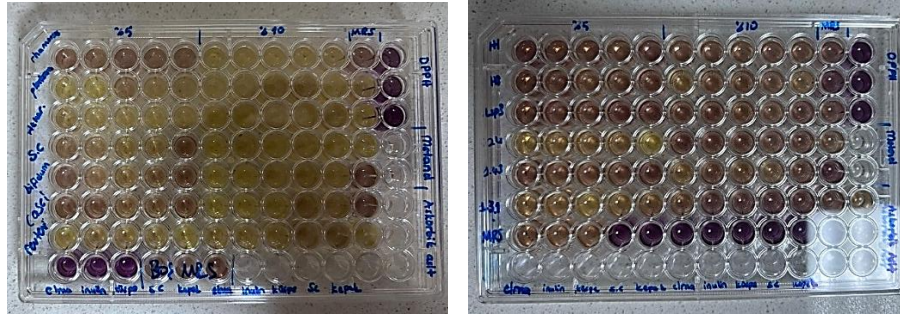
4.3.5 Antioksidan aktivitenin belirlenmesi

Bakterilerin antioksidan yeteneğini ölçmek için plazmanın demir indirgeme yeteneği (FRAP) ve DPPH deneyleri sık olarak kullanılmaktadır. Bu deneylerde numunelerin radikal bileşikleri azaltma ve temizleme konusundaki antioksidan gücü belirlenmektedir (Talib vd., 2019).

Kolostrumdan izole edilen bakterilerin süpernatantlarının antioksidan aktivitesini ölçmek için DPPH yöntemi kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak askorbik asit kullanılmıştır. Ticari suşlar ve izolatların modifiye besiyerlerinin antioksidan aktivitesinin olup olmadığı test edilmiştir. Görsel 4.10'da deneyin uygulandığı plaka görüntüsünde de görüldüğü gibi postbiyotiklerin tümünde DPPH radikalinin renk kaybetmesi ile doğru orantılı bir şekilde, antioksidan aktivite olduğu görülmüştür. Ticari suşlar ve izolatların süpernatantlarının DPPH deneyi ile elde edilen antioksidan aktivitelerinin sonuçları Tablo 4.17 ve Tablo 4.18'de gösterilmiştir. Ayrıca pozitif kontrol olan askorbik asidin antioksidan aktivitesi %95,76 bulunmuştur.

Görsel 4.10

Ticari Suşlar ve İzolatların Modifiye Besiyerleri Süpernatantlarının DPPH Deneyi ile Antioksidan Aktivitelerinin 96 Kuyucuklu Plakadaki Görüntüsü



En düşük antioksidan aktiviteler H1 izolatında görülürken en iyi antioksidan aktivite ortalama olarak *L.plantarum*'da görülmektedir. MRS'ye kıyasla modifiye besiyerlerinde daha iyi antioksidan aktivite gösterenler ise *L.plantarum*'da %5 yer elması; *L.reuteri*'de %5 buğday kepeği ve %5 yer elması; H8 için %10 buğday kepeği %10 yer elması, %5-10 şeker pancarı küspesi, %10 inülin; Lsp3 için %10 *S.cerevisiae*, %10 inülin; 2.4 için %5 buğday kepeği ve %5 yer elması; 1.4.3 için %5-10 *S.cerevisiae*, %5-10 buğday kepeği şeklinde görülmektedir. MRS'ye kıyasla modifiye besiyerlerinde 1.3.1 izolatında tüm değerler düşük çıkmıştır.

Modifiye besiyerlerinde en iyi antioksidan aktivite *L.reuteri* %5 yer elmasında 85,38 şeklinde görülürken MRS'de en iyi antioksidan aktivite *B.bifidum*'da %88,05 şeklinde görülmüştür.

Tablo 4.17

Ticari Suşlar ve İzolatların Yer Elması, İnülin, Şeker Pancarı Küspesi Modifiye Besiyerleri Süpernatantlarının DPPH Deneyi ile % Antioksidan Aktiviteleri

	%5 yer elması	%10 yer elması	%5 inülin	%10 inülin	%5 Ş.p. küspesi	%10 Ş.p. küspesi
<i>L.rhamnosus</i>	67,46	80,18	64,99	68,12	60,20	76,79
<i>L.plantarum</i>	82,82	78,36	84,14	76,63	72,33	78,61
<i>A.muciniphila</i>	80,18	82,99	80,26	79,19	78,12	73,41
<i>S.cerevisiae</i>	70,93	83,48	72,42	75,56	77,54	79,27
<i>B.bifidum</i>	63,09	81,91	72,17	73,49	76,05	80,35
<i>L.casei</i>	68,78	85,63	63,75	79,44	70,19	83,15
<i>L.reuteri</i>	85,38	83,40	79,44	80,02	79,19	79,11
H1	56,07	66,88	62,34	62,42	61,68	68,45
H8	71,60	77,70	73,00	76,97	76,47	76,39
Lsp3	71,68	75,73	74,58	81,60	72,01	75,56
2.4	82,33	71,43	71,92	70,20	72,83	68,21
1.4.3	62,01	77,37	62,92	63,91	63,17	68,87
1.3.1	77,54	68,29	73,41	55,24	78,53	58,30

Tablo 4.18

Ticari Suşlar ve İzolatların S.cerevisiae, Buğday Kepeği Modifiye Besiyerleri Süpernatantları ve MRS Süpernatantlarının DPPH Deneyi ile % Antioksidan Aktiviteleri

	%5 <i>S.cerevisiae</i>	%10 <i>S.cerevisiae</i>	%5 buğday kepeği	%10 buğday kepeği	%100 MRS
<i>L.rhamnosus</i>	66,31	83,81	65,15	78,78	86,64
<i>L.plantarum</i>	80,02	74,98	79,11	81,50	81,75
<i>A.muciniphila</i>	77,45	78,20	78,53	78,45	85,30
<i>S.cerevisiae</i>	76,71	82,41	64,82	82,49	86,46
<i>B.bifidum</i>	71,10	81,58	64,57	84,39	88,05
<i>L.casei</i>	70,02	78,36	63,66	78,45	83,42
<i>L.reuteri</i>	81,67	79,68	84,06	76,22	82,58
H1	66,72	63,17	55,41	67,63	60,36
H8	74,49	74,65	73,58	77,21	74,75
Lsp3	67,14	76,06	68,63	69,04	73,00
2.4	72,91	71,43	82,08	70,94	78,87
1.4.3	73,25	75,32	76,31	74,41	71,86
1.3.1	73,49	62,02	73,57	68,46	78,96

4.4 Prebiyotiklerin Hazırlanması

Yer elması, buğday kepeği, şeker pancarı küspesi, *S. cerevisiae* ve inülin prebiyotik kaynağı olarak kullanılmıştır. Prebiyotiklerden MRS besiyerinin içerisinde hacimce %5 ve %10 konsantrasyonlarında olacak şekilde modifiye besiyerleri hazırlanmıştır. Hazırlanan her modifiye besiyerine izolasyonu yapılan bakterilerle birlikte Tablo 3.14'teki standart suşlardan %1'lik ekim yapılmıştır. Modifiye besiyerlerine ekilen bakterilerin büyüme eğrilerinin çıkarılması amacıyla 0 ila 48. saatleri arasında iki saatte bir alınan örneklerden, spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür. 48. saatin sonunda ise biyokütle tayini için 45°C'de etüvde kurutmaya bırakılmıştır.

Ticari suşlar ve izolatların modifiye besiyerlerinin biyokütleleri Tablo 4.19'da büyüme eğrileri ise Şekil 4.4 ila Şekil 4.29 arasında gösterilmektedir.

1.3.1 büyüme eğrisinde %5 oranında kullanımın modifiye besiyerlerinde MRS'ye benzer şekilde ilerlediği görülmüştür. %10'da ise *S.cerevisiae* ve buğday kepeğinde MRS'ye yetişmemiştir. 1.4.3 ve Lsp3'te %5 oranında kullanımın modifiye besiyerlerinde *S.cerevisiae* hariç MRS'ye benzer şekilde ilerlediği görülmüştür. %10'da ise *S.cerevisiae* MRS'ye yetişmemiştir. 2.4'te %5 oranında kullanımın modifiye besiyerlerinde MRS'ye benzer şekilde ilerlediği görülmüştür. %10'da ise *S.cerevisiae* ve buğday kepeği MRS'ye yetişmemiştir. H1'de %5 oranındaki modifiye besiyerlerinde MRS'ye kıyasla daha yüksek bir gelişim görülmüş olup sadece *S.cerevisiae*'de MRS'ye benzer bir büyüme

eğrisi elde edilmiştir. %10 oranındaki kullanımda ise MRS'ye kıyasla tüm modifiye besiyerlerinde daha iyi bir gelişim görülmüştür. H8'de %5 ve %10 oranındaki sonuçlarda MRS'ye kıyasla daha düşük olduğu görülmüş ama her iki oranda da benzer büyüme eğrileri ortaya çıkmıştır. *A. muciniphila*'da %5 ve %10 oranındaki sonuçlarda *S.cerevisiae* ve buğday kepeği hariç MRS'ye benzer eğriler görülmüştür. *B. bifidum*'da %5 ve %10 oranındaki sonuçlarda *S.cerevisiae* ve buğday kepeği hariç MRS'ye benzer eğriler görülmüştür. Ancak *S.cerevisiae* ve buğday kepeği eğri değerleri de MRS'ye yakın seyretmiştir. *L.casei*'de %5 oranındaki modifiye besiyerlerinde *S.cerevisiae* hariç MRS'ye benzer eğriler görülürken %10 oranındaki sonuçlarda *S.cerevisiae* ve buğday kepeği hariç MRS'ye benzer eğriler görülmüştür. *L.plantarum*'da %5 oranındaki modifiye besiyerlerinde *S.cerevisiae* ve buğday kepeği hariç MRS'ye benzer eğriler görülmüştür. %10'da ise *S.cerevisiae* ve buğday kepeği verileri %5 oranına göre daha da düşük seyrederken şeker pancarı küspesi ve yer elması MRS'ye kıyasla daha düşük eğriler göstermekte olup eğrileri benzer seyretmektedir. *L.reuteri*'de %5 oranındaki sonuçlarda *S.cerevisiae* hariç MRS'ye benzer eğriler görülmüştür. %10'da ise *S.cerevisiae* ve buğday kepeği verileri %5 oranına göre daha da düşük seyrederken şeker pancarı küspesi ve yer elması MRS'ye kıyasla daha düşük eğriler göstermekte olup eğrileri benzer seyretmektedir. *L.rhamnosus*'da ise %5 oranında hazırlanan modifiye besiyerlerindeki sonuçlarda *S.cerevisiae* hariç MRS'ye benzer eğriler görülmüştür. %10'da ise *S.cerevisiae* ve buğday kepeği verileri %5 oranına göre daha da düşük seyrederken şeker pancarı küspesi ve yer elması MRS'ye kıyasla daha düşük eğriler göstermekte olup eğrileri benzer seyretmektedir. *S.cerevisiae*'de %5 oranında hazırlanan modifiye besiyerlerindeki sonuçlarda *S.cerevisiae* hariç MRS'ye benzer eğriler görülmüştür. %10'da ise buğday kepeği MRS eğrisine daha da yakınlaşırken şeker pancarı küspesi, yer elması ve inülin MRS'ye kıyasla daha yüksek oranda büyüme eğrisi göstermiştir. %10 *S.cerevisiae*'da MRS'ye kıyasla daha düşük veriler görülmüştür.

Genel olarak büyüme eğrilerine bakıldığında %5-10 *S.cerevisiae*'lı modifiye besiyerleri MRS büyüme eğrisinin gerisinde kalmıştır. Diğer prebiyotiklerle hazırlanan besiyerlerinde ise %10 buğday kepeği hariç MRS büyüme eğrisine benzer olduğu görülmüştür. Biyokütleler ise MRS'ye kıyasla genel olarak yüksek çıkmıştır.

Büyüme eğrilerinde MRS'ye oranla daha iyi sonuçlar H1 izolatında %5-10 buğday kepeği, %5-10 yer elması, %5-10 şeker pancarı küspesi, %5-10 inülin, %10

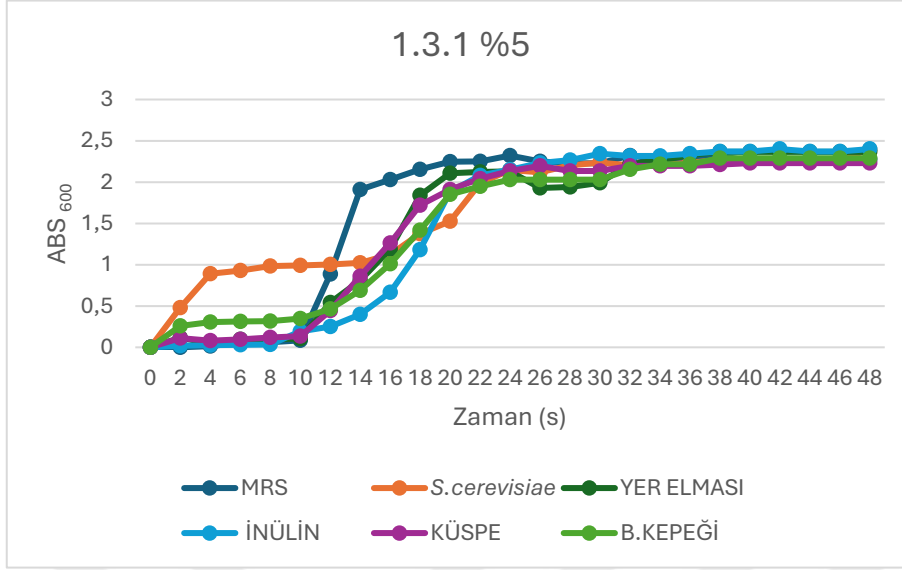
S.cerevisiae'da görülmüştür. En iyi biyokütle ise 8.0 gram ile *S.cerevisiae* %10 *S.cerevisiae*'de görülmüştür.

Tablo 4.19

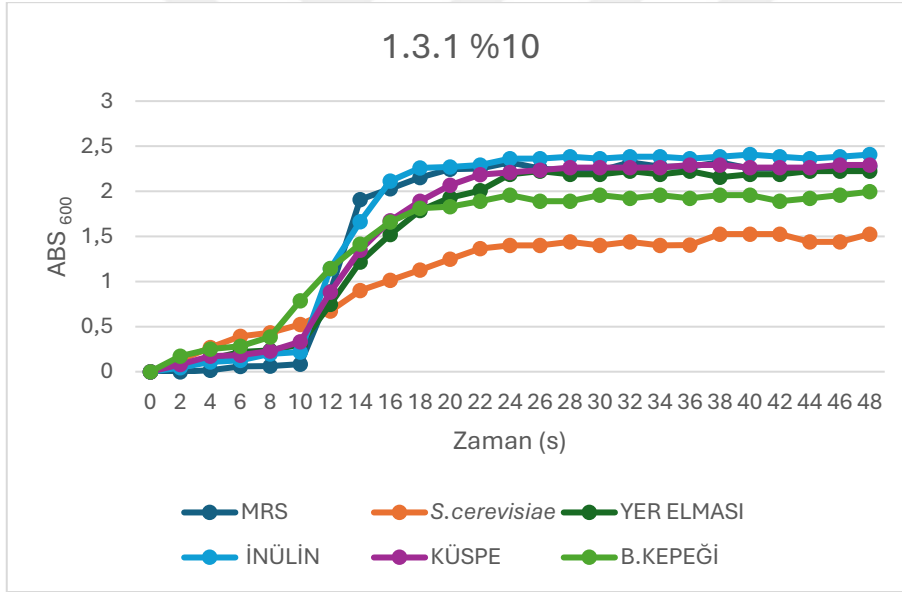
Ticari Suşlar ve İzolatların Modifiye Besiyerlerinden Elde Edilen Biyokütleler (gram)

		Buğday kepeği	Yer elması	İnülin	Ş.p.küspesi	<i>S. cerevisiae</i>
1.4.3	%5	3.28	2.1	2	2.16	2.3
	%10	5.6	3.48	3.24	2.89	5.85
	%100 MRS	3.75				
1.3.1	%5	5.0	3.7	3.4	4.2	4.9
	%10	3.5	2.3	2.5	2.4	3.6
	%100 MRS	3.6				
2.4	%5	4.7	4.1	3.6	4.2	4.9
	%10	4.4	2.6	2.5	3.6	3.8
	%100 MRS	2.6				
Lsp3	%5	3.72	3.25	2.7	3.0	3.68
	%10	4.2	3.63	2.84	2.92	4.0
	%100 MRS	2.2				
H1	%5	4.13	5.87	4.25	4.4	5.3
	%10	4.35	3.55	6.6	4.2	3.95
	%100 MRS	3.3				
H8	%5	2.7	1.6	2.16	3.05	2.3
	%10	2.67	3.56	2.66	2.44	2.87
	%100 MRS	3.75				
B.bifidum	%5	4.24	3.93	3.3	3.7	4.57
	%10	4.84	4.76	4.2	4.07	6.64
	%100 MRS	2.65				
S.cerevisiae	%5	2.3	2.6	2.6	3.2	4.3
	%10	6.84	5.42	3.97	4.96	8.0
	%100 MRS	2.55				
A.muciniphila	%5	4.9	2.96	2.84	4.2	4.2
	%10	4.6	4.27	3.0	4.07	7.45
	%100 MRS	3.15				
L.rhamnosus	%5	3.5	2.9	2.53	2.9	2.9
	%10	4.0	5.51	3.65	4.34	5.72
	%100 MRS	2.7				
L.plantarum	%5	3.4	3.05	2.52	3.0	4.16
	%10	4.4	2.85	2.44	3.3	5.44
	%100 MRS	3.15				
L.reuteri	%5	4.55	3.6	2.9	3.44	4.16
	%10	3.9	3.04	2.7	4.2	5.8
	%100 MRS	3.0				
L.casei	%5	3.9	3.14	2.83	2.23	2.77
	%10	5.56	5.52	4.91	4.68	6.12
	%100 MRS	3.1				

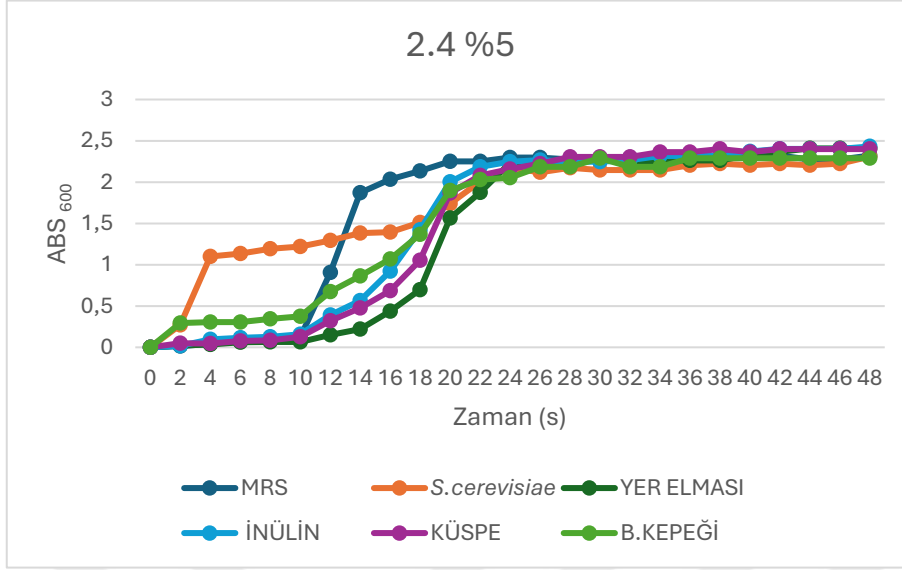
Şekil 4.4 1.3.1 İzolatının %5 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi



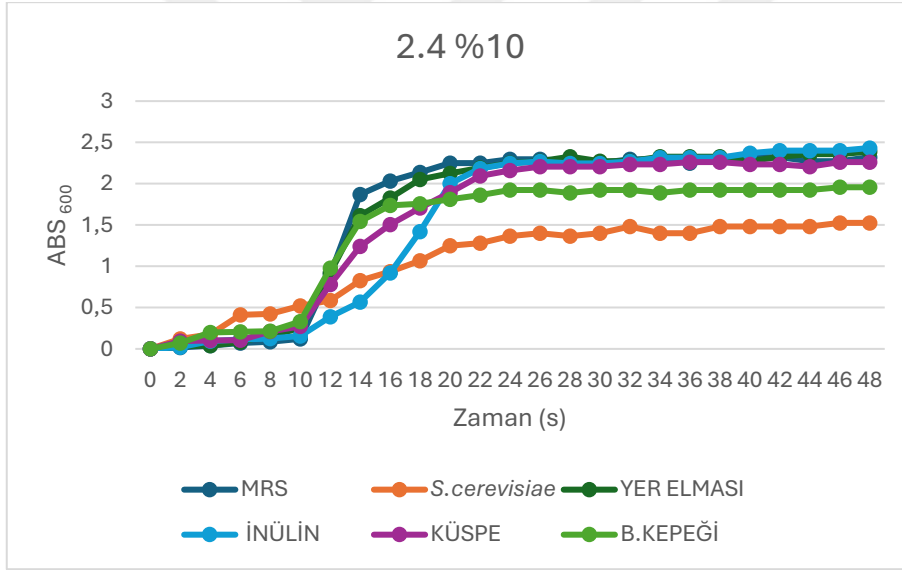
Şekil 4.5 1.3.1 İzolatının %10 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi



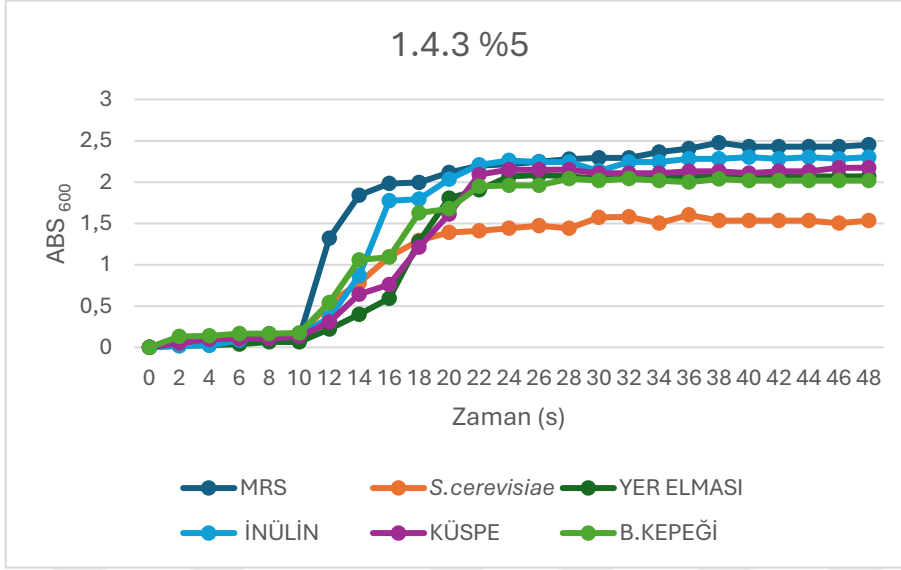
Şekil 4.6 2.4 İzolatının %5 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi



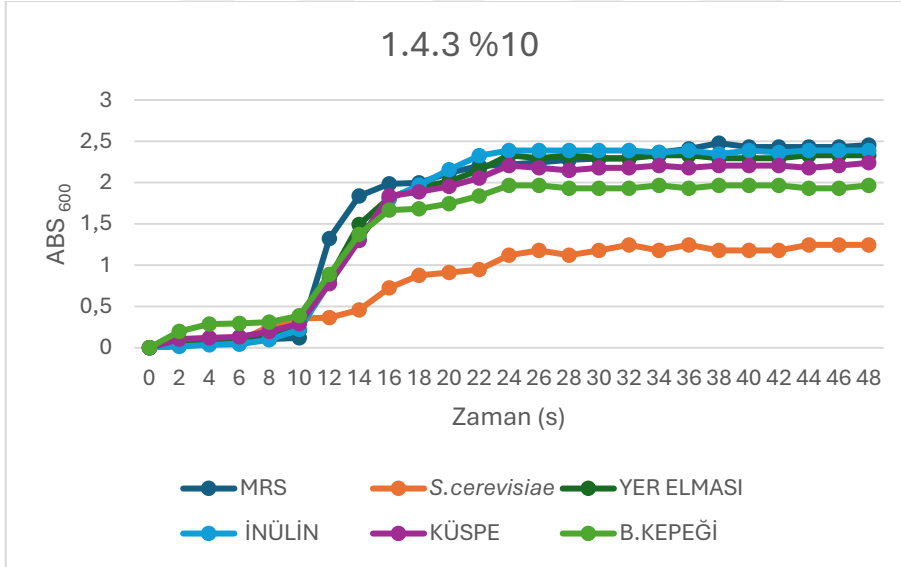
Şekil 4.7 2.4 İzolatının %10 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi



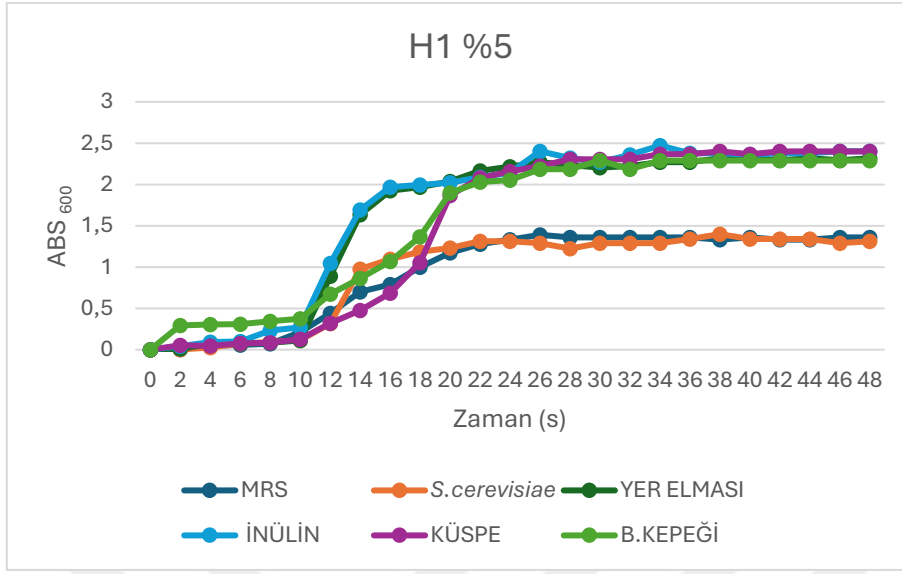
Şekil 4.8 1.4.3 İzolatının %5 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi



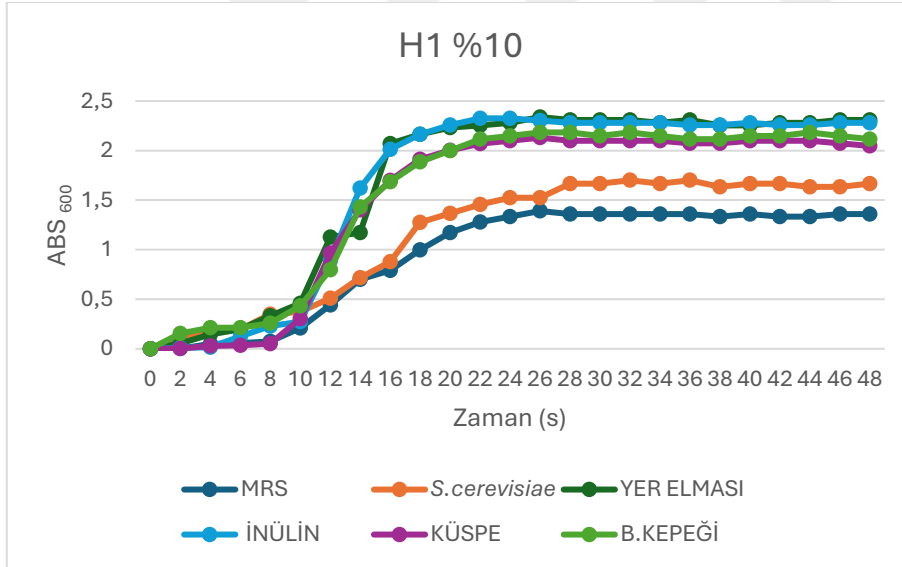
Şekil 4.9 1.4.3 İzolatının %10 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi



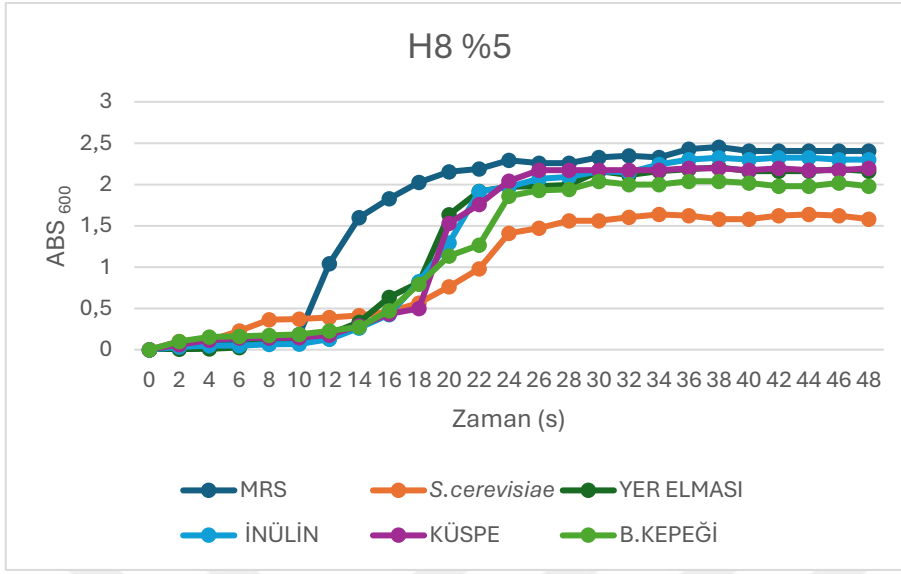
Şekil 4.10 H1 İzolatının %5 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi



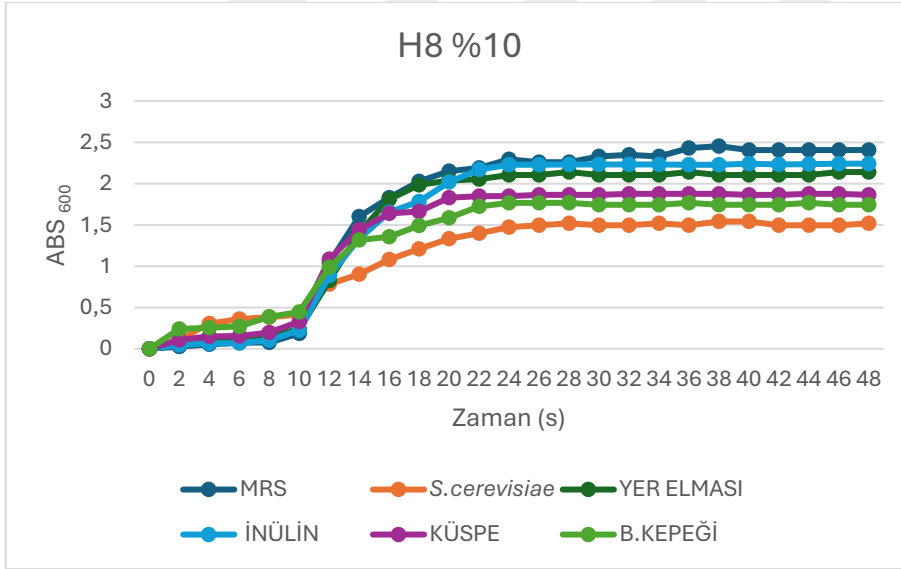
Şekil 4.11 H1 İzolatının %10 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi



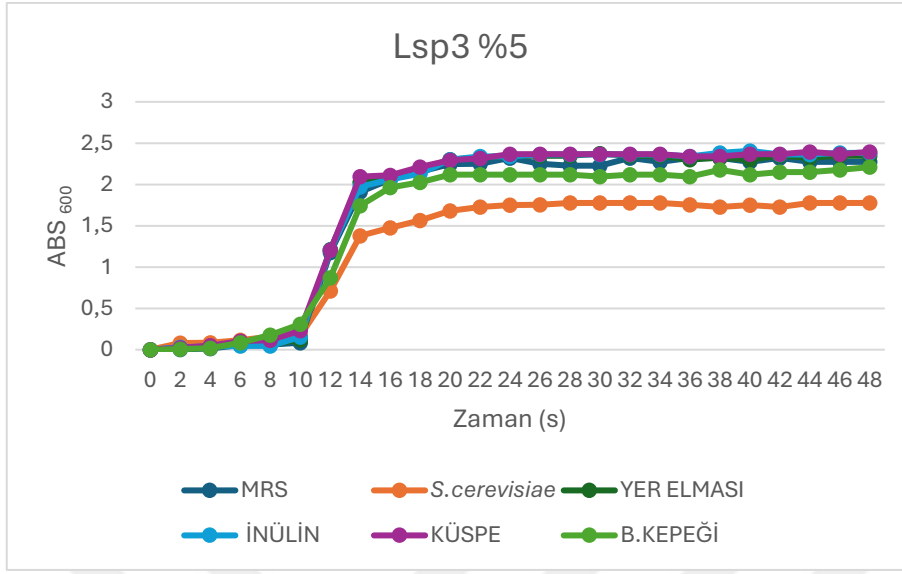
Şekil 4.12 H8 İzolatının %5 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi



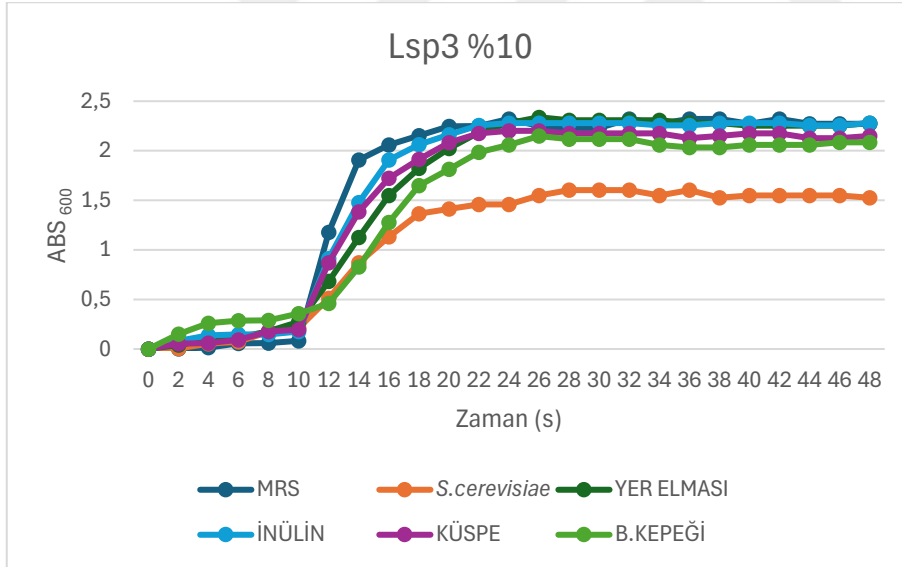
Şekil 4.13 H8 İzolatının %10 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi



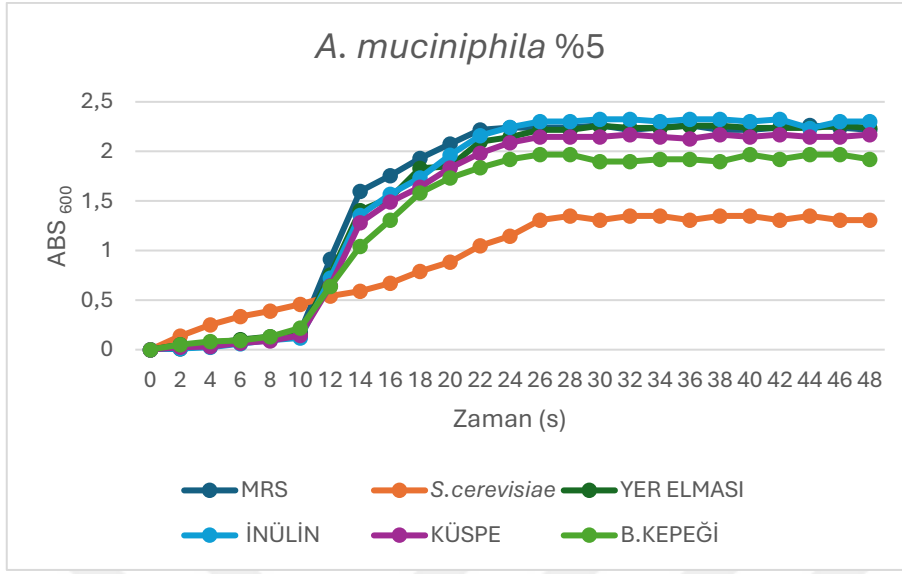
Şekil 4.14 Lsp3 İzolatının %5 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi



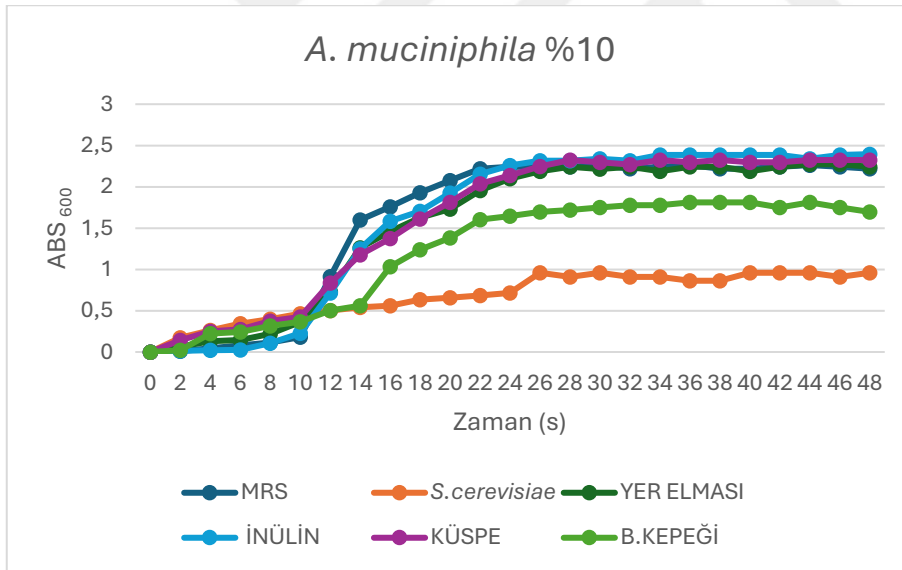
Şekil 4.15 Lsp3 İzolatının %10 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi



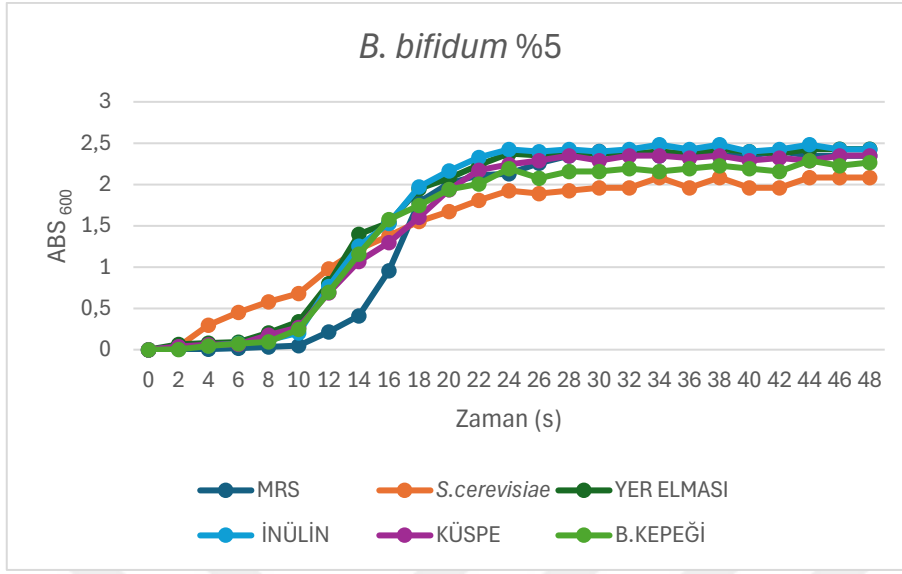
Şekil 4.16 *A.muciniphila* Ticari Suşun %5 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi



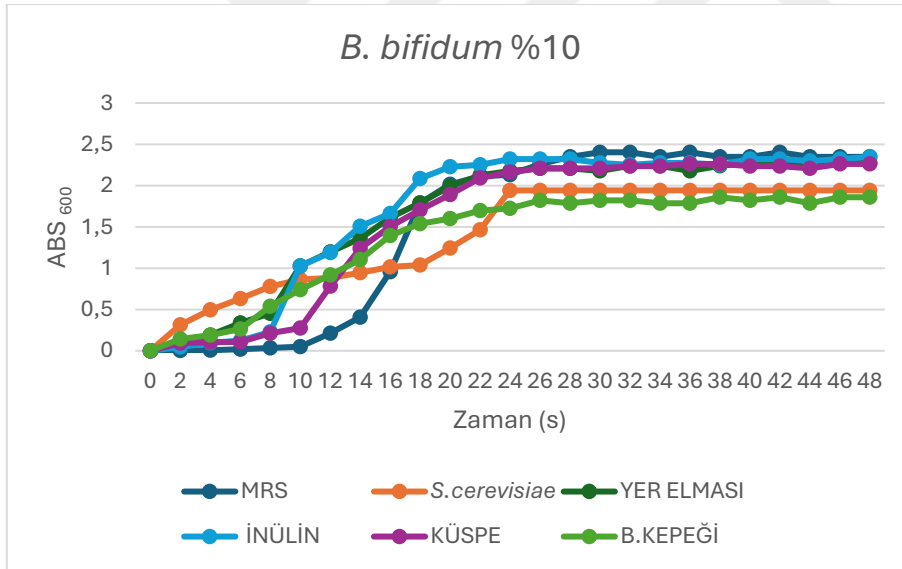
Şekil 4.17 *A.muciniphila* Ticari Suşun %10 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi



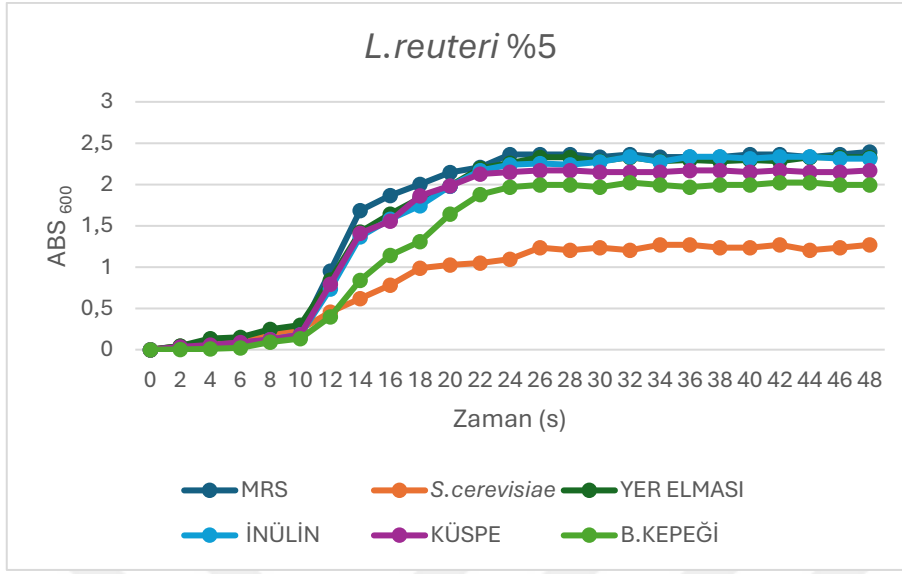
Şekil 4.18 *B.bifidum* Ticari Suşun %5 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi



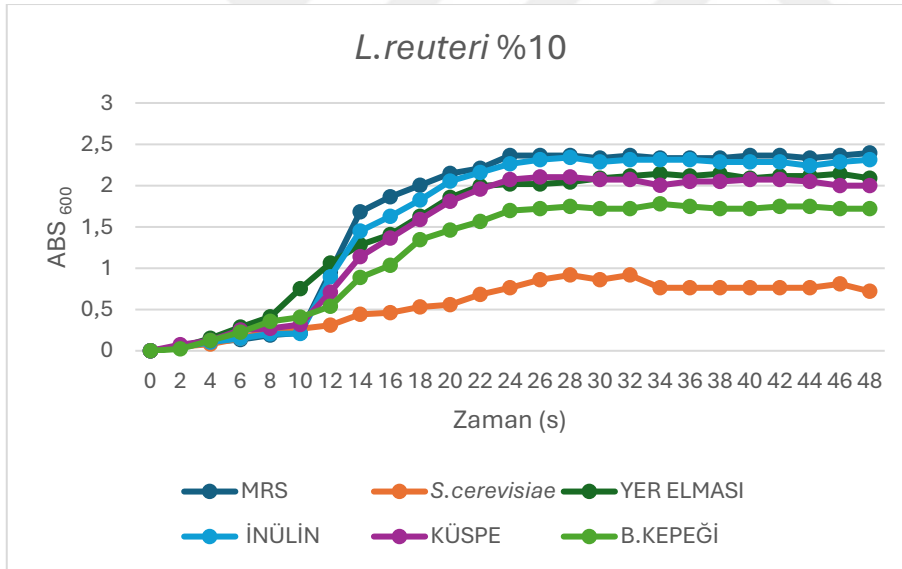
Şekil 4.19 *B.bifidum* Ticari Suşun %10 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi



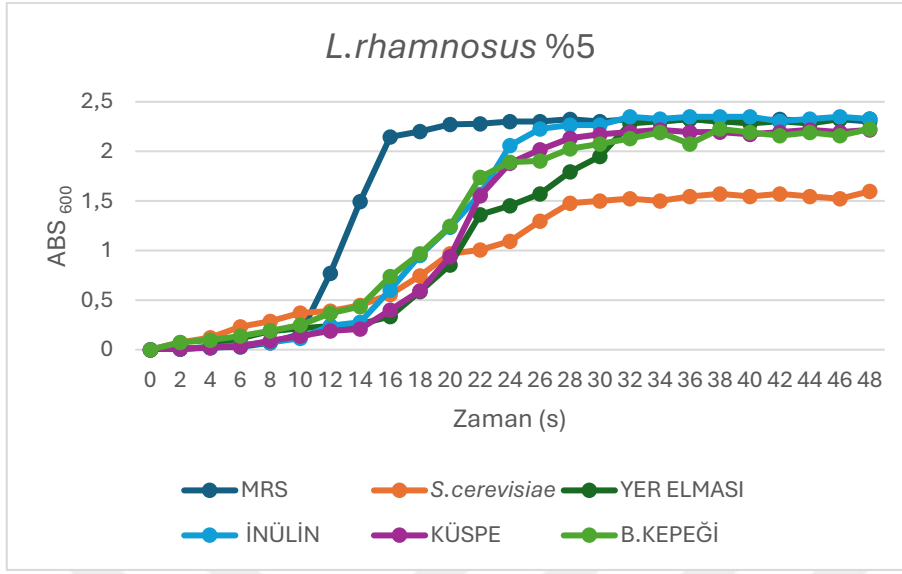
Şekil 4.20 *L.reuteri* Ticari Suşun %5 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi



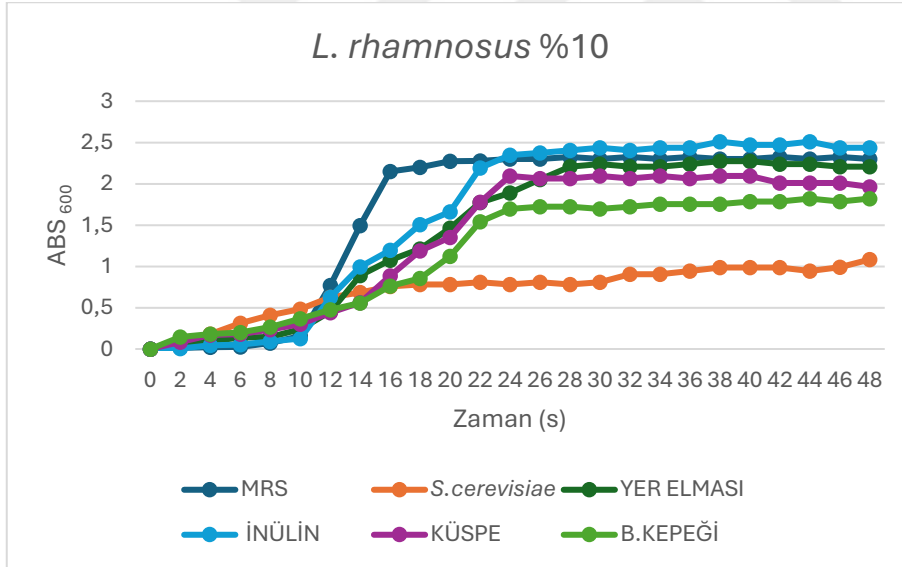
Şekil 4.21 *L.reuteri* Ticari Suşun %10 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi



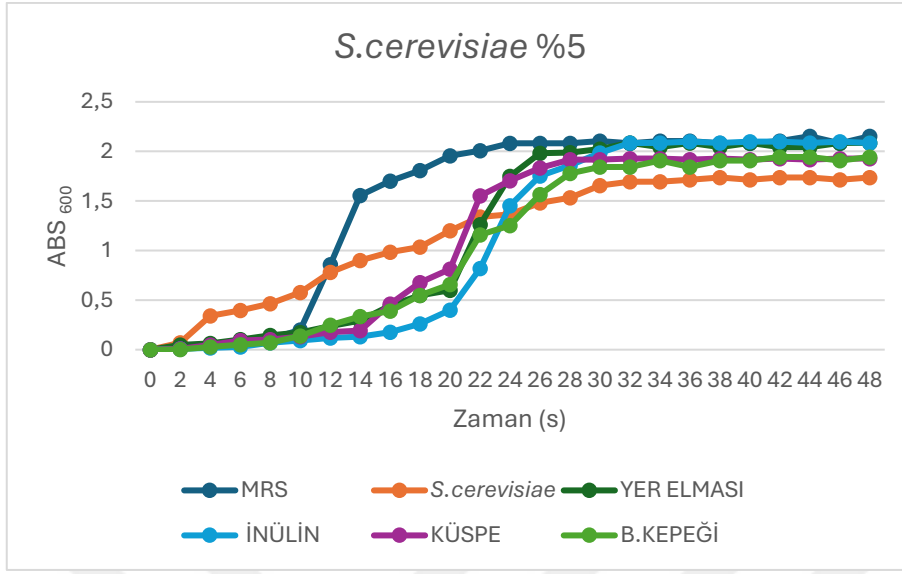
Şekil 4.22 *L.rhamnosus* Ticari Suşun %5 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi



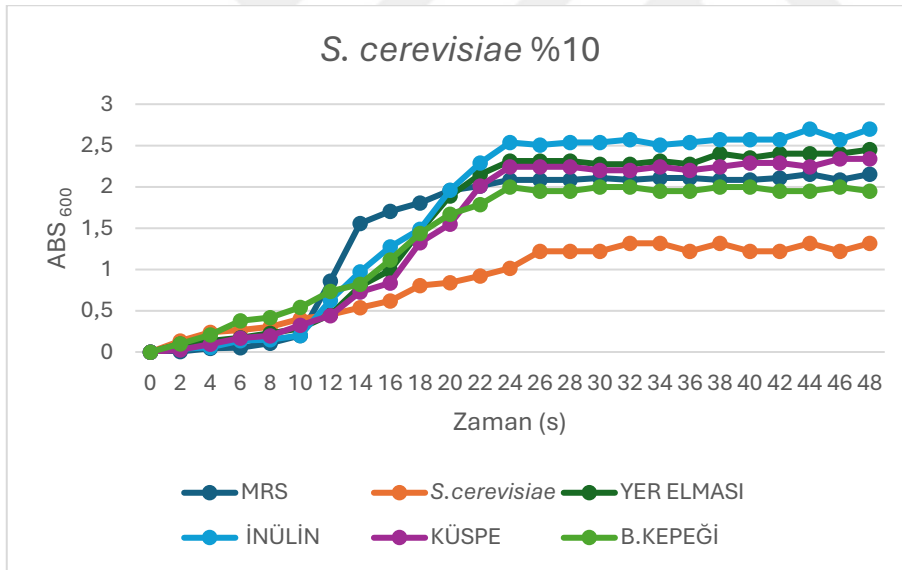
Şekil 4.23 *L.rhamnosus* Ticari Suşun %10 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi



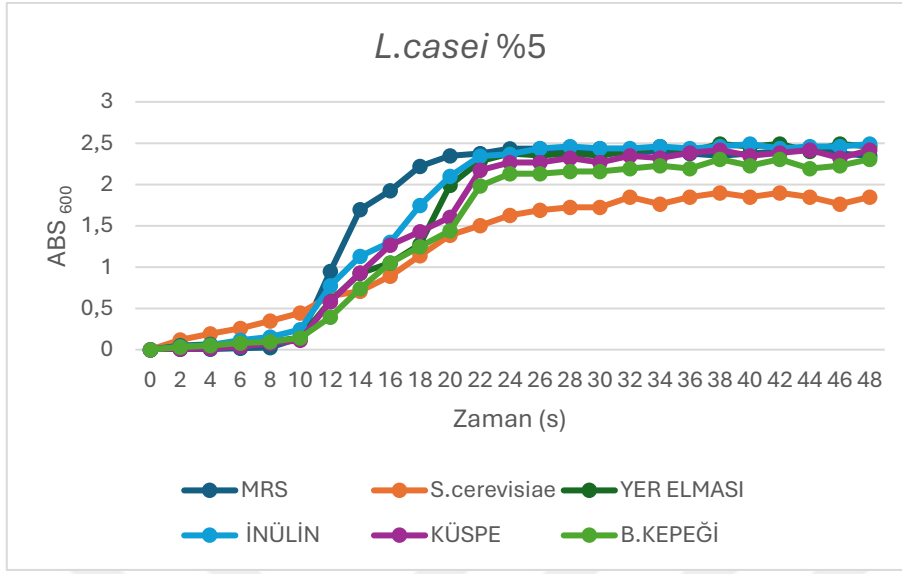
Şekil 4.24 *S.cerevisiae* Ticari Suşun %5 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi



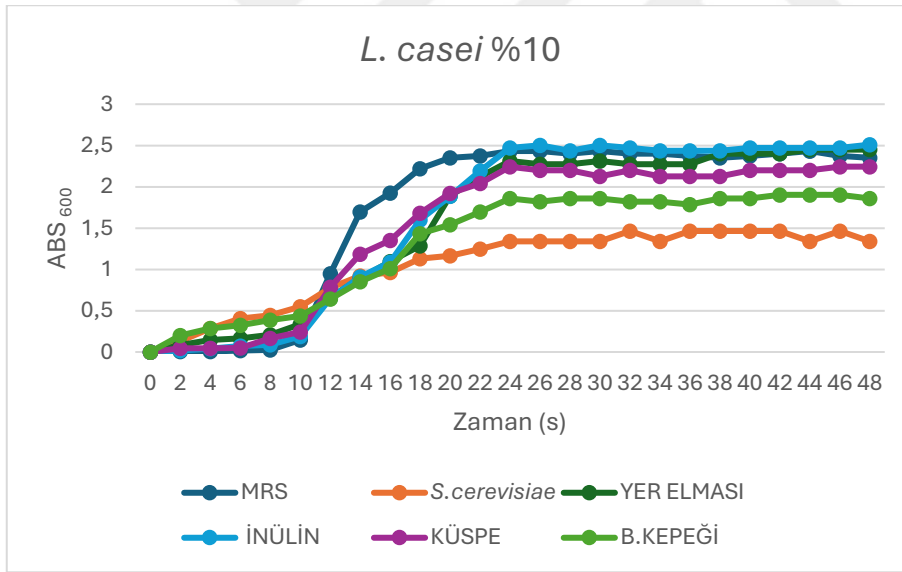
Şekil 4.25 *S.cerevisiae* Ticari Suşun %10 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi



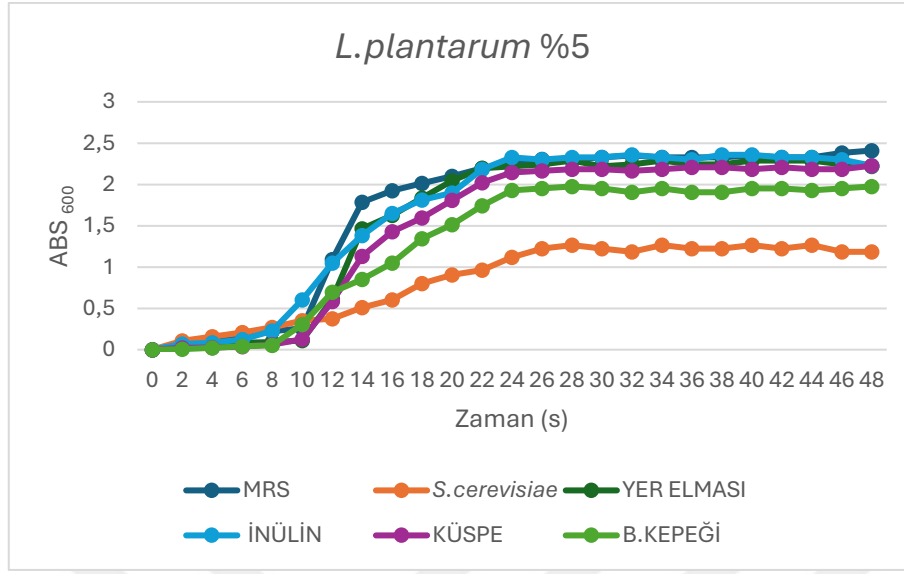
Şekil 4.26 *L.casei* Ticari Suşun %5 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi



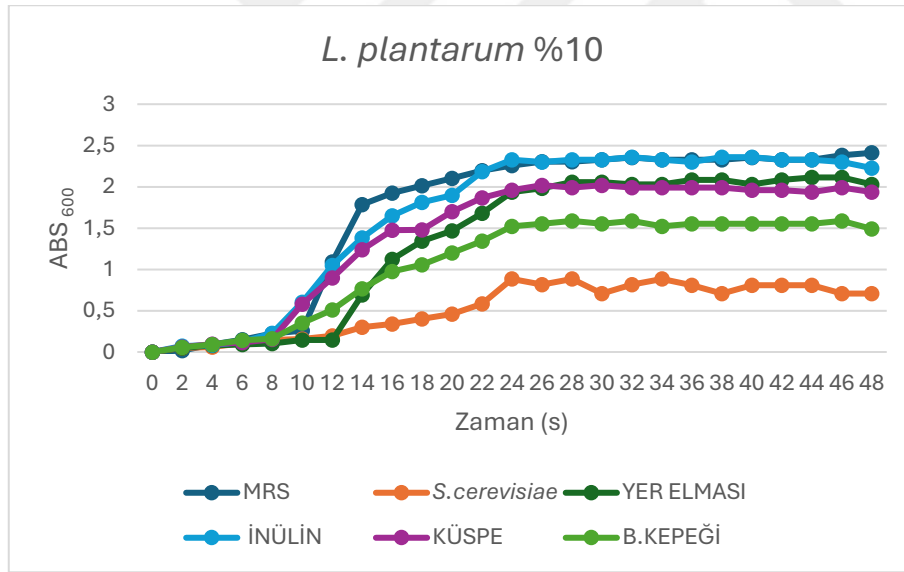
Şekil 4.27 *L.casei* Ticari Suşun %10 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi



Şekil 4.28 *L.plantarum* Ticari Suşun %5 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi



Şekil 4.29 *L.plantarum* Ticari Suşun %10 Şeklinde Hazırlanmış Modifiye Besiyerlerindeki Büyüme Eğrisi



4.5 Bakterilerin Enzim Taramaları

Ticari suşlar ve izole edilen bakterilerin lipaz, amilaz, lipaz ve fitaz enzim aktivitelerinin tarama çalışmaları agar difüzyon yöntemleri yapılmıştır. Taramalar tüm enzimler için petri yöntemi ile bakılmıştır. Ayrıca lipaz (MAK046-Sigma), proteaz (539125-Sigma) ve fitaz (KPhytase-Megazyme) enzimleri için kit prosedürleri uygulanmıştır. Bu kitler ticari

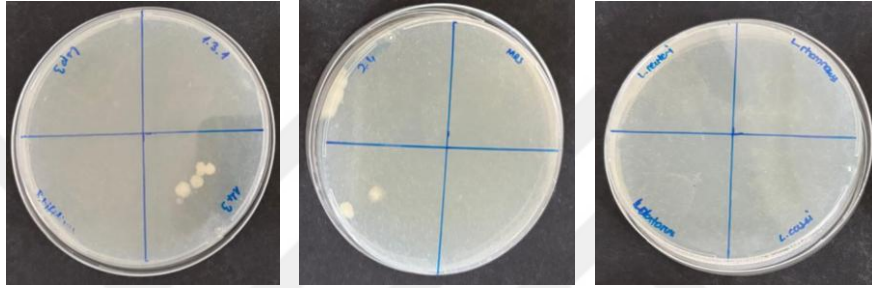
suşlar ve izolatların MRS fermentasyon sıvıları ile biyokütle açısından en iyi sonuç veren modifiye besiyerlerinin fermentasyon sıvılarına uygulanmıştır.

4.5.1 Lipaz aktivitesinin tespiti

Tribütrin Agar ile lipaz aktivitesi tespit edilmiştir. Ancak inkübasyondan sonra herhangi bir zon oluşumu görülmemesinden dolayı izole edilen bakteriler ve ticari suşlarda lipaz aktivitesi olmadığı sonucuna ulaşılmıştır (Görsel 4.11).

Görsel 4.11

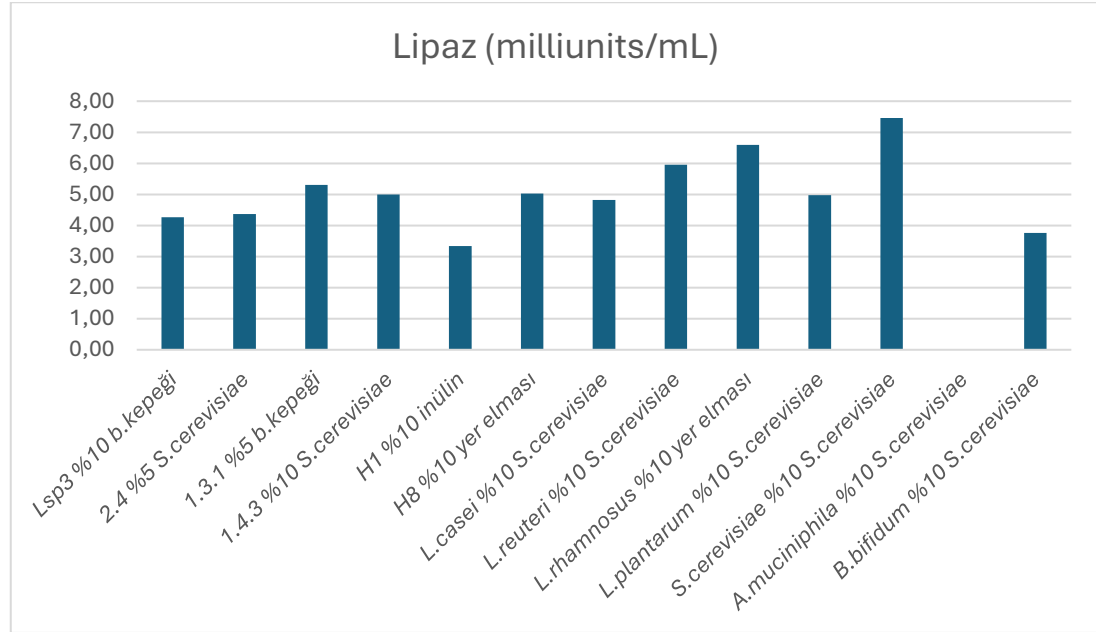
Ticari Suşlar ve İzolatların Tribütrinli Agarda Görünüm Örnekleri



Ayrıca ticari suşlar ve izolatların lipaz (MAK046-Sigma) aktivitesine kit ile bakılmıştır. Buna ek olarak bakterilerin fermentasyon sıvıları ile biyokütle açısından en iyi sonuç veren modifiye besiyerlerinin fermentasyon sıvılarına da uygulanmıştır. Bakterilerin kit ile bakılan lipaz aktivitesinde sonuç yok olarak görünürken biyokütle açısından en iyi sonuç veren modifiye besiyerlerinin fermentasyon sıvılarındaki sonuçlar Şekil 4.30'da gösterilmektedir. Modifiye besiyerlerindeki lipaz aktivitesi sonuçlarına göre en iyi sonuç *S.cerevisiae* %10 *S.cerevisiae*'de görülmüştür.

Şekil 4.30

Ticari Suşlar ve İzolatların Modifiye Besiyerleri Fermentasyon Sıvılarının Lipaz Aktivitesi

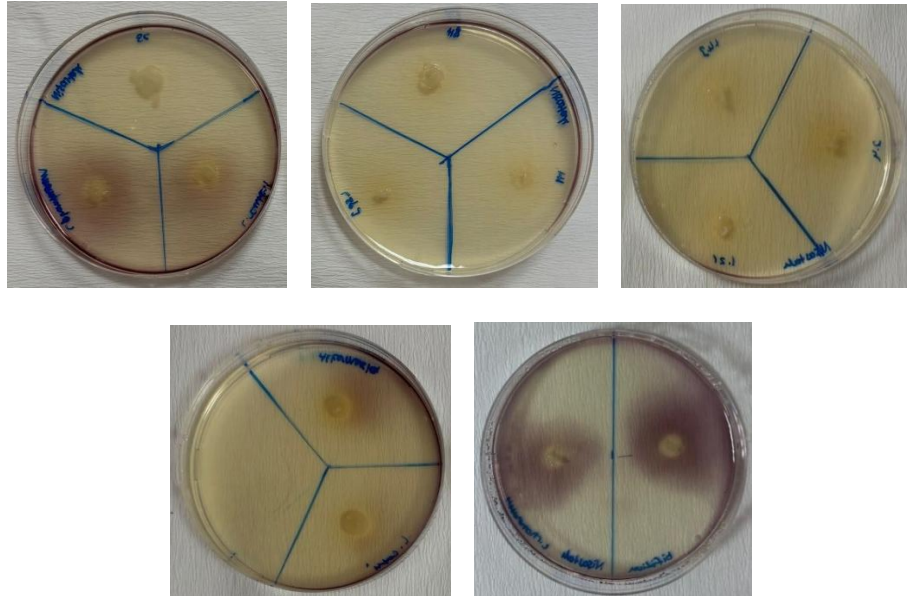


4.5.2 Amilaz aktivitesinin tespiti

Ticari suşlar ve izole edilen bakterilerin Nişastalı Agar'da aktivite gösterdiği görülmüş ve amilaz aktivitesinin olduğu sonucuna varılmıştır (Görsel 4.12).

Görsel 4.12

Ticari Suşlar ve İzolatların Nişastalı Agarda Görünümü



4.5.3 Proteaz aktivitesinin tespiti

Yağsız süt tozu içeren agarlı besiyerlerinde agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile proteaz aktivitesine bakılan ticari suşlar ve izole edilen bakterilerin tümünde saydam-beyaz bir zon oluşumu görülmüş ve proteaz aktivitesi varlığı tespit edilmiştir (Tablo 20 ve Görsel 4.13). En iyi aktivite *A.muciniphila*'da görülürken en düşük zon H8 ve *S.cerevisiae*'da görülmüştür.

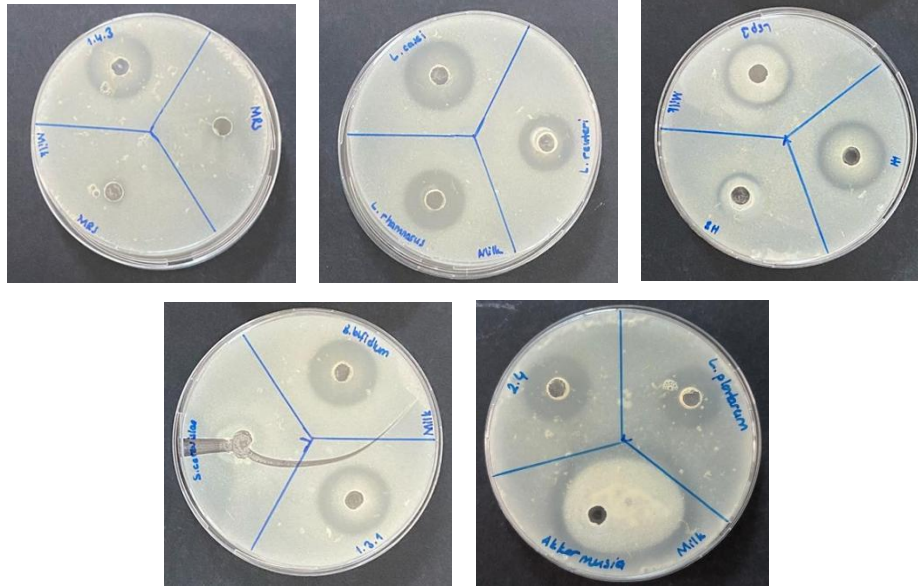
Tablo 4.20

İzolatların ve Ticari Suşların Skim Milk Agar Besiyerinde Oluşturduğu Zon Çapları (mm)

	Zon Çapları		Zon Çapları
1.3.1	10	<i>L.plantarum</i>	7
1.4.3	10	<i>L.casei</i>	11
H8	5	<i>L.reuteri</i>	6
H1	10	<i>B.bifidum</i>	10
2.4	8	<i>A.muciniphila</i>	20
Lsp3	10	<i>S.cerevisiae</i>	5
<i>L.rhamnosus</i>	10		

Görsel 4.13

Ticari Suşlar ve İzolatların Skim Milk Agarda Oluşturduğu Zonlar



Ayrıca bakterilerin fermentasyon sıvıları ile biyokütle açısından en iyi sonuç veren modifiye besiyerlerinin fermentasyon sıvılarına proteaz (539125-Sigma) aktivitesine kit ile bakılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.21’de gösterilmektedir. Buradaki sonuçlar kit içeriğinde verilen grafik ile karşılaştırılarak Units Tripsin miktarına ulaşılabilir.

Tablo 4.21*Fermentasyon Sıvılarının Proteaz Aktivitesi*

Fermentasyon sıvıları	Proteaz aktivitesi (ABS)	Fermentasyon sıvıları	Proteaz aktivitesi (ABS)
Lsp3	0,08	Lsp3 %10 b.kepeği	0,05
2.4	0,06	2.4 %5 <i>S.cerevisiae</i>	0,06
1.3.1	0,05	1.3.1 %5 b.kepeği	0,06
1.4.3	0,05	1.4.3 %10 <i>S.cerevisiae</i>	0,05
H1	0,05	H1 %10 inülin	0,05
H8	0,06	H8 %10 yer elması	0,05
<i>L.casei</i>	0,06	<i>L.casei</i> %10 <i>S.cerevisiae</i>	0,05
<i>L.reuteri</i>	0,06	<i>L.reuteri</i> %10 <i>S.cerevisiae</i>	0,05
<i>L.rhamnosus</i>	0,05	<i>L.rhamnosus</i> %10 yer elması	0,06
<i>L.plantarum</i>	0,06	<i>L.plantarum</i> %10 <i>S.cerevisiae</i>	0,05
<i>S.cerevisiae</i>	0,06	<i>S.cerevisiae</i> %10 <i>S.cerevisiae</i>	0,06
<i>A.muciniphila</i>	0,06	<i>A.muciniphila</i> %10 <i>S.cerevisiae</i>	0,06
<i>B.bifidum</i>	0,07	<i>B.bifidum</i> %10 <i>S.cerevisiae</i>	0,06

4.5.4 Fitaz aktivitesinin tespiti

Sodyum Fitat'lı besiyerinde nokta ekim yöntemi ile fitaz aktivitesine bakılan ticari suşlar ve izole edilen bakterilerin 2.4 izolatu hariç tümünde saydam bir zon oluşumu görülmüş ve fitaz aktivitesi varlığı tespit edilmiştir. Saydam zon çapının genişliğine göre en çok aktivite *L.reuteri*'de görülmüştür (Tablo 4.21 ve Görsel 4.14).

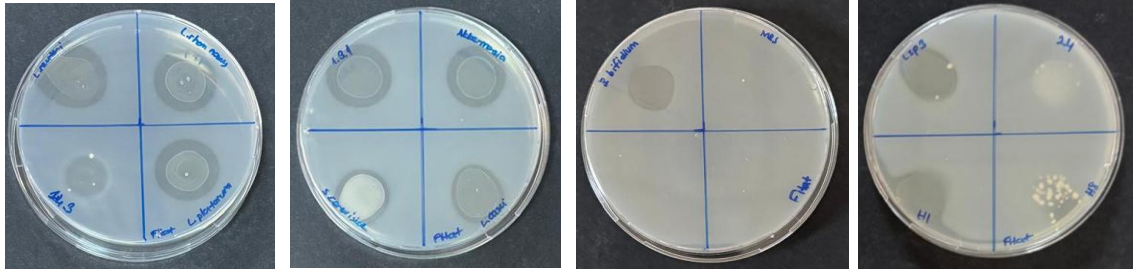
Tablo 4.22*İzolatların ve Ticari Suşların Sodyum Fitatlı Besiyerinde Oluşturduğu Zon Yarıçapları*

	1.3.1	1.4.3	Lsp3	H8	H1	<i>L.casei</i>
Oluşturduğu zon yarıçapları	++++	+	++/	++++	+++/-	++
	<i>L.plantarum</i>	<i>L.rhamnosus</i>	<i>L.reuteri</i>	<i>A.muciniphila</i>	<i>B.bifidum</i>	<i>S.cerevisiae</i>
Oluşturduğu zon yarıçapları	++++	++++	+++++	++++	+	++

Not*: Her (+) 1 mm'ye; (/) 0,5 mm'ye karşılık gelmektedir.

Görsel 4.14

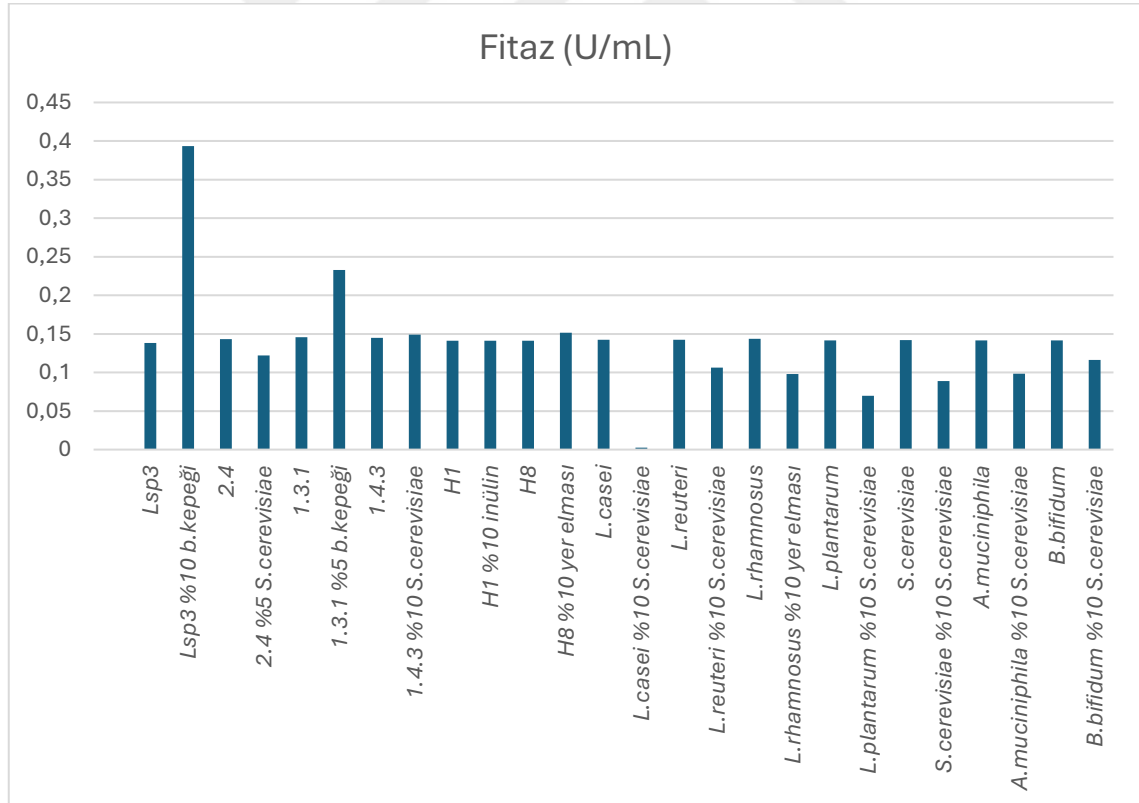
Ticari Suşlar ve İzolatların Sodyum Fitatlı Besiyerinde Oluşturduğu Zonlar



Ayrıca bakterilerin fermentasyon sıvıları ile biyokütle açısından en iyi sonuç veren modifiye besiyerlerinin fermentasyon sıvılarına fitaz (KPhytase-Megazyme) aktivitesine kit ile bakılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.31’de gösterilmektedir. En iyi sonuç Lsp3 %10 buğday kepeğinde görülmektedir.

Şekil 4.31

Ticari Suşlar ve İzolatların Modifiye Besiyerleri Fermentasyon Sıvılarının Fitaz Aktivitesi



4.6 Fermentasyon Sıvılarının Organik Asit Tayini

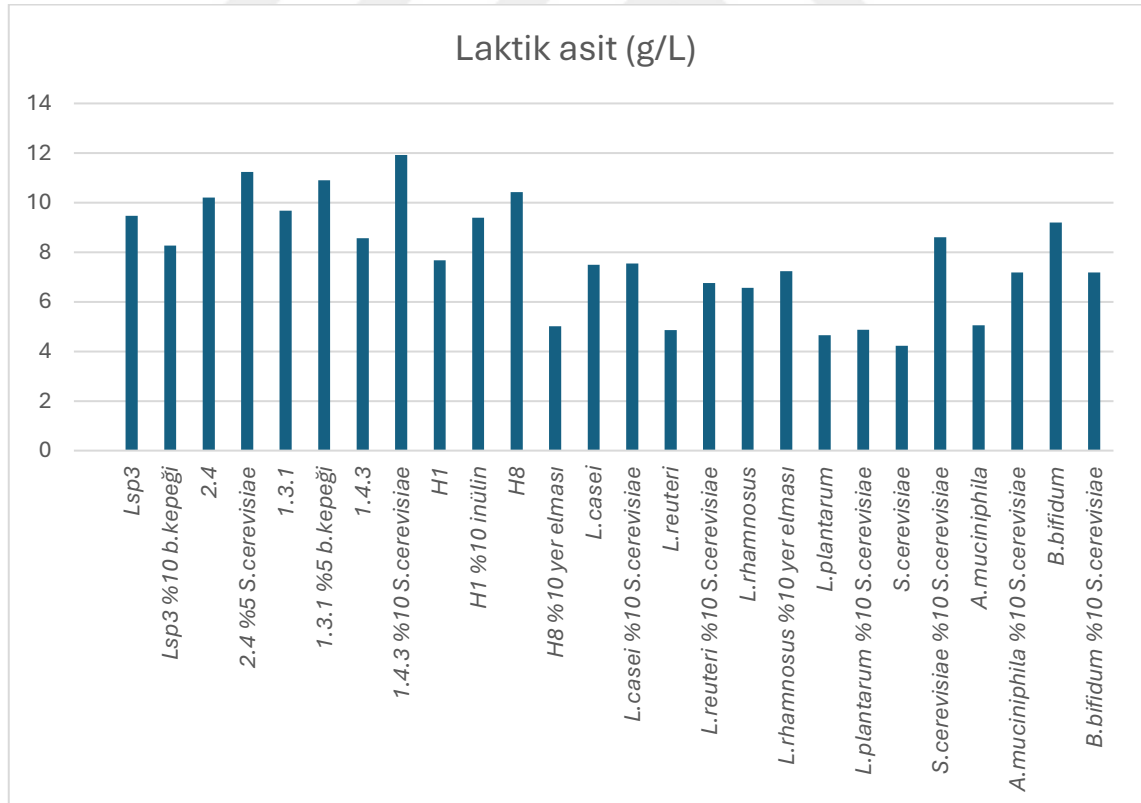
Fermentasyon sıvılarının organik asit tayini için L-laktik asit (K-LATE-Megazyme), asetik asit (K-ACETRM-Megazyme), bütirik asit (K-HDBA- Megazyme) kit prosedürlerine göre uygulanmıştır. Bu kitler ticari suşlar ve izolatların MRS fermentasyon sıvıları ile biyokütle açısından en iyi sonuç veren modifiye besiyerlerinin fermentasyon sıvılarına uygulanmıştır.

4.6.1 Laktik asit üretim tayini

K-LATE-Megazyme kiti beraberinde verilen prosedür uygulanmıştır. En iyi sonuç 1.4.3%10 *S.cerevisiae* modifikasyonunda görülmüştür. En iyi değişim ise *S.cerevisiae* MRS'si ile modifikasyonu arasında görülmüştür (Şekil 4.32). Laktik asit üretim tayini için ayrıca bakterilere ve fermentasyon sıvılarına titrasyon deneyi yapılmıştır.

Şekil 4.32

Ticari Suşlar ve İzolatların Modifiye Besiyerleri Fermentasyon Sıvılarının Laktik Asit Miktarı



İzolatların ve ticari suşların laktik asit üretimi daha önceden belirtilen formüle (3.4) göre hesaplanmıştır (Görsel 4.15). Tablo 4.23'te görüldüğü gibi en az laktik asit üretimi *S.cerevisiae*'de görülmüştür.

Tablo 4.23*İzolatların ve Ticari Suşların % Laktik Asit Üretimi*

İzolatlar	% Laktik Asit Üretimi	Ticari Suşlar	% Laktik Asit Üretimi
1.4.3	3,15	<i>L.casei</i>	2,7
2.4	3,15	<i>L.reuteri</i>	3,15
1.3.1	3,15	<i>L.rhamnosus</i>	3,15
Lsp3	3,15	<i>L.plantarum</i>	3,15
H1	3,15	<i>B.bifidum</i>	2,25
H8	3,15	<i>A.muciniphila</i>	2,7
		<i>S.cerevisiae</i>	1,8

Görsel 4.15*Laktik Asit Üretim Tayininde İzolatların ve Ticari Suşların Görünüm Örnekleri*

Tablo 4.24*Fermentasyon Sıvılarının % Laktik Asit Üretimi*

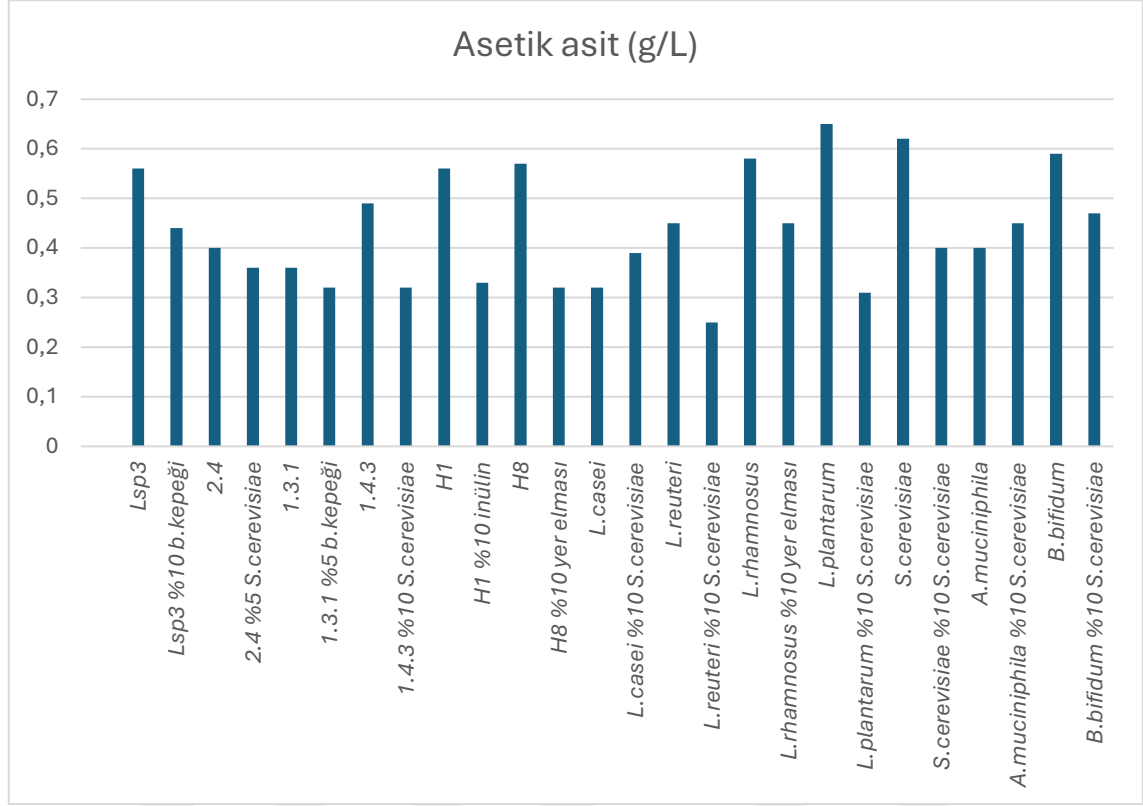
Fermentasyon Sıvıları	% Laktik Asit Üretimi
Lsp3	3,6
Lsp3 %10 buğday kepeği	3,15
1.3.1	3,6
1.3.1 %5 buğday kepeği	3,15
1.4.3	3,6
1.4.3 %10 şeker pancarı küspesi	3,15
2.4	3,6
2.4 %5 <i>S.cerevisiae</i>	3,15
H1	3,15
H1 %10 inülin	3,15
H8	4,05
H8 %10 yer elması	3,15
<i>L.casei</i>	3,15
<i>L.casei</i> %10 <i>S.cerevisiae</i>	2,7
<i>L.reuteri</i>	3,15
<i>L.reuteri</i> %10 <i>S.cerevisiae</i>	3,15
<i>L.rhamnosus</i>	3,15
<i>L.rhamnosus</i> %10 yer elması	3,15
<i>L.plantarum</i>	3,6
<i>L.plantarum</i> %10 <i>S.cerevisiae</i>	3,15
<i>S.cerevisiae</i>	2,7
<i>S.cerevisiae</i> %10 <i>S.cerevisiae</i>	3,15
<i>A.muciniphila</i>	3,15
<i>A.muciniphila</i> %10 <i>S.cerevisiae</i>	2,7
<i>B.bifidum</i>	2,7
<i>B.bifidum</i> %10 <i>S.cerevisiae</i>	2,7

4.6.2 Asetik asit üretim tayini

K-ACETRM-Megazyme kiti beraberinde verilen prosedür uygulanmıştır. En iyi sonuç *L.plantarum*'da görülürken modifiye besiyerlerinde ise en iyi sonuç *B.bifidum* %10 *S.cerevisiae*'da görülmüştür. MRS ile modifiye besiyerlerinin fermentasyon sıvıları arasında modifiye besiyerinin pozitif yönde en iyi değişim *L.casei* ile *A.muciniphila*'da görülmüştür (Şekil 4.33).

Şekil 4.33

Ticari Suşlar ve İzolatların Modifiye Besiyerleri Fermentasyon Sıvılarının Asetik Asit Miktarı

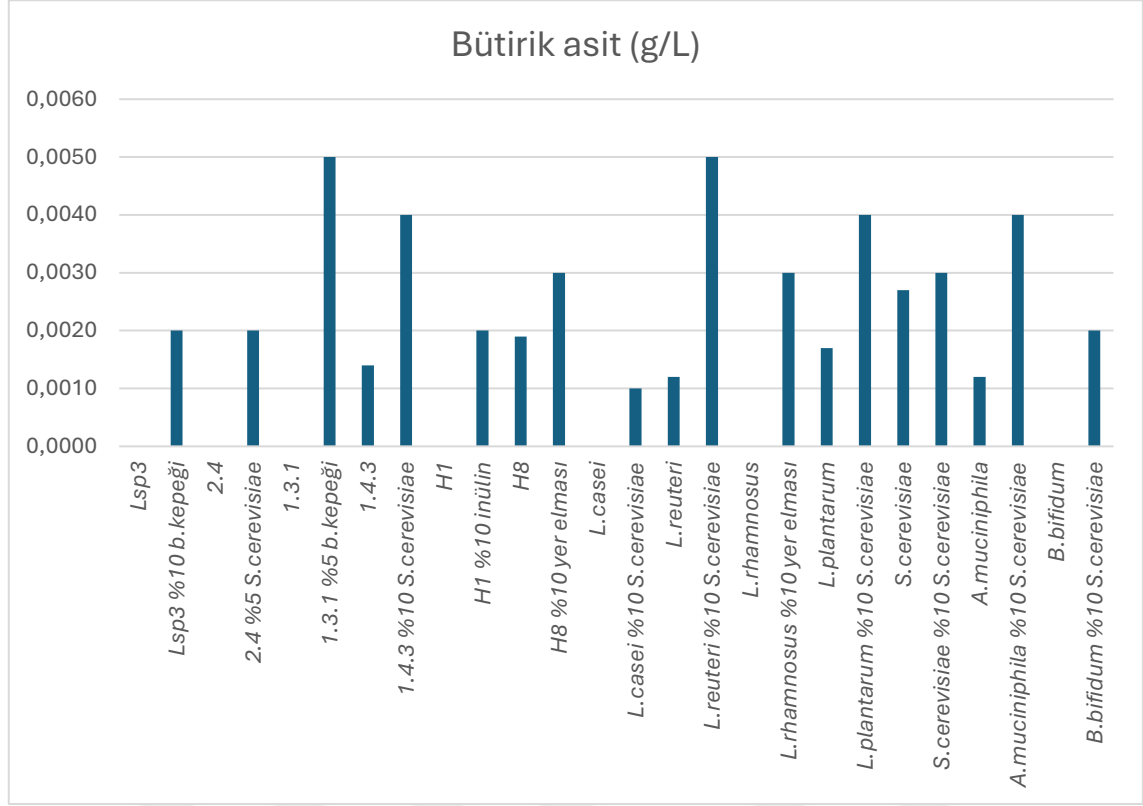


4.6.3 Bütirik asit üretim tayini

K-HDBA- Megazyme kiti beraberinde verilen prosedür uygulanmıştır. En iyi sonuçlar 1.3.1 %5 buğday kepeği ile *L.reuteri* %10 *S.cerevisiae*'da görülmüştür. MRS ile modifiye besiyerlerinin fermentasyon sıvıları arasında modifiye besiyerinin pozitif yönden en iyi değişim 1.3.1 ile *L.reuteri*'de görülmüştür (Şekil 4.34).

Şekil 4.34

Ticari Suşlar ve İzolatların Modifiye Besiyerleri Fermentasyon Sıvılarının Bütirik Asit Miktarı



4.7 Moleküler İdentifikasyon

16S rRNA gen dizilimine göre; Sanger dizileme ile elde edilen okumalar, bir konsensüs dizi oluşturmak amacıyla kontig haline getirilmiştir. Bu işlemin gerçekleştirilmesinde BioEdit yazılımı içinde CAP contig assembly algoritması kullanılmıştır. Diziler NCBI (National Center for Biotechnology Information) üzerinden eşleştirilerek en yakın türler belirlenmiştir. Test sonucunda H1 için benzerlik oranı %99.86 olarak bulunmuş ve *Enterococcus faecalis*, H8 için benzerlik oranı %99.93 olarak bulunmuş ve *Lactobacillus brevis* olarak ifade edilmiştir. İzole edilen diğer suşlar ise benzerlik oranları %99.80 olarak bulunmuş *Lacticaseibacillus rhamnosus* olarak belirlenmiştir.

5 SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

5.1 Sonuç ve Tartışma

Tez çalışması kapsamında; kolostrumdan ve keçi sütünden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, klasik ve moleküler yöntemlerle tanımlanması, antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi, laktik asit üretimi, hemolitik aktiviteleri, safra tuzu ve asit dirençleri, enzim aktiviteleri araştırılmıştır. İzole edilen suşlar arasından laktik asit bakterileri seçilmiş ve prebiyotiklerle kombinasyonları yapılmıştır. Formülize edilen besiyerlerine ekimleri yapılan ticari suşlar ve izole edilen bakterilerin büyüme eğrileri ve biyokütleleri tespit edilmiştir. LAB'lar gram pozitif, spor oluşturmayan, aside dayanıklı, mikroaerofilik, basil/kok şeklindeki mikroorganizmalardır (Meruvu & Harsa, 2023).

Potansiyel probiyotik olarak nitelendirilen bakterilerin asit direnci göstermesi, suşların canlılığını ve işlevselliğini garanti altına almak için bakterilerin seçiminde dikkate alınan genel kriterlerden biri olarak kabul görmektedir (Fontana vd., 2013). Probiyotik bakterilerin bağırsağa ulaşmadan önce mideden geçişi atlatmaları yani aside karşı dirençli olmaları gerekmektedir (Dunne vd., 2001).

Tez çalışmamızda kolostrum ve keçi sütünden toplam 20 tane izolat elde edilmiştir. Bu izolatların gram boyama ve katalaz testi sonucu elde edilen verilerle 7 tanesi ile deneylere devam edilmiştir. Bu izolatlara safra tuzu ve asit dirençleri deneyleri uygulanmıştır. İzolatlardan bir tanesi düşük pH ortamında büyüme göstermediğinden 6 izolat ile deneylere devam edilmiştir. Hemolitik aktivitelerine bakılan 6 izolatın tümünde hemolitik aktivite olmadığı yani γ -hemolitik olduğu görülmüştür.

Haghshenas ve arkadaşlarının yürüttüğü bir çalışmada 11 tane LAB izolatının pH 2 ve pH 3'te üreme aktivitelerine bakılmış ve 11 tanesinin pH 3'te, 7 tanesinin pH 2'de ürediği görülmüştür. LAB'ların düşük pH'a karşı aktivitelerinin azaldığı belirtilmiştir (Haghshenas vd., 2023). Yapılan başka bir çalışmada ise *L.rhamnosus* ve *L.bulgaricus*'un aside karşı direnç yeteneklerine bakılmıştır. *L.rhamnosus*'un pH 3-7 aralığında ürediğini fakat pH 1'de canlılık kaybı olduğunu ifade edilmiştir. *L.bulgaricus*'un ise pH 3'te canlılıkta azalma olduğu ve pH 1'de ise hiç canlılık faaliyeti olmadığı görülmüştür (Goldin vd., 1992).

Safra tuzları lipofilik bileşiklerin sindirimini kolaylaştırmakla beraber bağırsak mikrobiyotasının oluşumunu doğrudan etkileyerek antimikrobiyal bir ajan olarak

davranmaktadır. İnsanda safranin konsantrasyonları %0.3 ile %0.5 arasında değişmektedir (C. Y. Wang vd., 2010). Üst bağırsak yolunda safra, değişken ve öngörülemeyen konsantrasyonda olabilmektedir. Bu nedenle, probiyotik bir suş safra tuzuna karşı tolerans göstermelidir (Shokryazdan vd., 2017).

Çiğ deve sütünden izole edilen *Bifidobacterium* ve LAB'larla yürütülen bir çalışmada izolatların tümünde %0.3, %0.5 ve %1 safra tuzu konsantrasyonlarına karşı tolerans etme yeteneği görülmüştür. Maksimum sağkalım %0.3 safra tuzu konsantrasyonunda görülürken en az %1'de gözlenmiştir (Yasmin vd., 2020). Yürütülen başka bir çalışmada ise izolatlar %0.3, %0.5 ve %1 oranına safra tuzu içeren MRS ile kontrol olarak safra tuzu içermeyen MRS ortamına ekilmiştir. 37°C'de 24 saatlik bir inkübasyondan sonra, spektrofotometrede absorbans 560 nm'de ölçülmüştür. Kontrole göre büyüme yüzdesi hesaplanmıştır. Tüm izolatların %0.3, %0.5 ve %1 ortamında ürettiği görülmüştür. Dört izolatın %0.3 safra varlığında en yüksek safra direncini gösterdiği ifade edilmiştir (Belicová vd., 2013).

Probiyotik olarak kullanılan suşların önemli bir biyogüvenlik özelliği olarak kan hemolitik kapasitesinin olmaması gerekmektedir. Bu da sadece γ -hemoliz özellik gösteren suşların güvenli olarak kabul edilmesi şeklinde söylenmektedir. Kolonilerin etrafındaki yeşil zonlar α -hemoliz, kolonilerin etrafındaki berrak zonlar β -hemoliz ve kolonilerin etrafında zon yoksa γ -hemoliz olarak ifade edilmektedir. Sadece γ -hemolizli suşlar güvenli olarak kabul edilir (Kowalczyk vd., 2024; Yasmin vd., 2020).

İran loru'ndan izole edilen 5 tane LAB ile yürütülen bir çalışmada tamamının kanlı agarda zon oluşturmadığı yani γ -hemolitik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (Haghshenas vd., 2023).

Probiyotik bakteriler antimikrobiyal aktivite göstermektedir. LAB tarafından üretilen organik asitler, yağ asitleri, hidrojen peroksit gibi çeşitli metabolik bileşikler antimikrobiyal etkilere sahiptir (Dunne vd., 2001).

Bu tez çalışmasında öncelikle agar kuyucuk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Burada postbiyotiklerin en yüksek aktivite gösterdiği 3 patojen bakteri seçilmiştir. Bu patojenler *E. coli* ATCC 35218, *P.aeruginosa* ve *S.aereus* şeklindedir. Seçilen 3 patojen bakteriyeye karşı modifiye besiyerlerinden elde edilen fermentasyon sıvıları ile agar kuyucuk difüzyon yöntemi tekrarlanmıştır. *E. coli* ATCC 35218'in modifiye besiyerleri ile elde edilen süpernatantlara karşı en çok zon oluşturan bakteri olduğu sonucuna varılmıştır.

1.3.1, 2.4, Lsp3, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* izolatlarının modifiye besiyerlerindeki fermantasyon sıvılarının *E. coli* ATCC 35218'e karşı MRS besiyerine karşı oluşturduğu zon çapı eşit veya büyük olduğu görülmüştür.

Mısır'da süttten izole edilen LAB'lar MRS besiyerinde geliştirilmiş ve 5000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmesiyle elde edilen süpernatant kısım kuyucuklara 50 µL konulmuştur. Kuyucukların etrafındaki zon çapı ölçülmüş ve 1 mm veya daha fazla olan berrak bir zon pozitif inhibisyon olarak kabul edilmiştir. Tüm suşlar *S. typhimurium* 'u en etkili şekilde inhibe ederken, *S. aureus*'a karşı etkinlik en az olarak görülmüştür (Mishra & Prasad, 2005).

Antimikrobiyal aktivite kapsamında yapılan mikrodilüsyon deneyi izole edilen bakterilerle yapıldığında en iyi aktivite *P. aeruginosa* 'a karşı görülürken en düşük değer ise *S. aureus* 'a karşı görülmüştür. Agar kuyucuk deneyinde ise Tablo 4.2'de görüldüğü gibi veriler tam örtüşmemektedir. Bunun nedeni olarak agar kuyucukta maddenin MHA tarafından çok iyi emilmemesi olarak düşünülmektedir. MİK için ayrıca modifiye besiyerlerine % değer belirlenmesi için ayrı bir deney yürütülmüştür. % MİK deneyinde genel olarak 2.4, *B.bifidum* ve 1.3.1'in yüksek oranlarda inhibe ettiği görülmüştür. MRS'sine kıyasla en iyi sonuçlar *E. coli* 35218'te *B. bifidum* %10 yer elması; *S. aereus*'ta *A. muciniphila* %10 şeker pancarı küspesi; *P.aeruginosa*'da 2.4 %10 *S.cerevisiae*'da görülmüştür.

Artocarpus heterophyllus'tan izole edilen LAB suşları (*Lactiplantibacillus plantarum* ngue16 ve *L. plantarum* ng10), *Eleiodoxa conferta*'dan izole edilen *Levilactobacillus brevis* w6 ile yürütülen bir çalışmada LAB'ların süpernatantları ile 96 kuyucuklu plakada yapılan MİK deneyinde seyreltme yöntemi kullanılarak MİK değeri belirlenmiştir. İlk olarak, her LAB suşunun süpernatantı 25 mg/mL konsantrasyonda MHB ile karıştırılmış ve seri seyreltme işlemi yapılmıştır. Daha sonra, seyreltilmiş süpernatantların 100 µL'si 96 kuyulu plakaların kuyularına aktarılıp belirlenen kuyucuklara da 100 µL taze patojen eklenmiştir. Plakalar daha sonra 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre ise *Lactiplantibacillus plantarum* ngue16 *B. subtilis* 'e karşı en düşük MİK değeri sergilemiştir. *S. aureus*'a karşı en düşük MİK değeri *Levilactobacillus brevis* w6'da gözlenmiştir. *L. plantarum* ng10 ve *Lactiplantibacillus plantarum* ngue16, *S. aureus* 'a karşı aynı MİK değeri göstermiştir (Qadi vd., 2023).

Oksidatif stres; lipitlere, proteinlere ve DNA'ya zarar veren fazla orandaki hücre içi oksijen radikallerini ifade etmektedir. Süperoksit anyon radikalleri, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit dahil olmak üzere reaktif oksijen türleri, aktif oksijen serbest radikallerinden biridir. Fazla miktarda reaktif oksijen türleri ateroskleroz, diyabet, alzheimer, nörodejeneratif hastalıklar ve KVH dahil olmak üzere çeşitli kronik hastalıklara yol açabileceği düşünülmektedir (Y. Wang vd., 2017). Probiyotik bakterilerin önemli antioksidan yeteneklere sahip olduğu ifade edilmektedir. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi probiyotiklerin oksidatif strese karşı koruma sağlamak için antioksidan kapasiteye sahip olduğu yapılan çalışmalarda ifade edilmiştir. Probiyotik türlerin antioksidan aktivitesinin altında yatan mekanizmalar ise şu şekilde söylenmektedir; probiyotik bakterilerin reaktif oksijen türlerini temizleyerek, metalleri şelatlayarak, antioksidan enzim seviyelerini artırarak ve mikrobiyotayı düzenleyerek antioksidan roller oynayabileceği öne sürülmüştür (Feng & Wang, 2020).

Serbest radikal süpürücü etki bakımından değerlendirilen ticari suşlar ve izole edilen bakterilerin formülize besiyerlerinin fermentasyon sıvıları ile yapılan deneyde tümünde antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Modifiye besiyerlerinde en iyi antioksidan aktivite *L.reuteri* %5 yer elmasında 85,38 şeklinde görülürken MRS'de en iyi antioksidan aktivite *B.bifidum*'da %88,05 şeklinde görülmüştür.

Ticari suşlar ve izolatların %5 ve %10 şeklinde yer elması, buğday kepeği, inülin, *S.cerevisiae*, şeker pancarı küspesi ile hazırlanmış modifiye besiyerlerindeki büyüme eğrileri incelendiğinde ise genel olarak %5 oranında MRS'ye büyüme eğrilerinin *S.cerevisiae* hariç yetişebildiği %10'da ise MRS'nin gerisinde kaldıkları görülmektedir.

Yer elması ile yürütülen bir çalışmada *L. paracasei* ve *L. plantarum* suşlarının yer elmasından elde edilen inülin açısından zengin karbonhidratlarla desteklenen MRS'de fermente olabildikleri ve büyüyebildikleri gösterilmiştir (Iraporda vd., 2019).

Ghamry ve arkadaşlarının arı bağırsağından izole ettiği *L.apis* bakterisiyle yürütülen çalışmada buğday kepeğinin biyoaktivitesini, besin değerini ve lezzet özelliklerini artırma yeteneği *S. cerevisiae* ve *L. plantarum*'a kıyaslanarak araştırılmıştır. Sonuç olarak *L. plantarum* ve *S. cerevisiae*'ya kıyasla *L. apis*, fenolikleri ve diğer metabolik bileşikleri değiştirerek, fitat bozunmasını iyileştirerek ve uçucu bileşik profilini, serbest amino asitleri, organik asitleri ve suda çözünen vitaminleri olumlu yönde değiştirerek buğday kepeğinin antioksidan aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı görülmüştür. *L.*

plantarum, fenolik bileşikleri , amino asitleri ve uçucu bileşenleri artırarak buğday kepeğinin biyoaktivitesini önemli ölçüde iyileştirebilmektedir. Bu durumda buğday kepeğinin antioksidan kapasitesini olumlu yönde etkiler. Buğday kepeğinin *S. cerevisiae* ve *Lactobacillus* türleri tarafından fermantasyonu birçok kanser hücresine karşı sitotoksik aktivitede önemli bir artış gösterdiği de ifade edilmektedir. Bu, aktif metabolik bileşiklerin salınmasından veya fermantasyon sırasında yapısal modifikasyonları yoluyla fitokimyasalların biyoaktivitesindeki artıştan kaynaklanıyor olabilir. Buna ek olarak, tahıl fermantasyonunun en önemli besinsel faydalarından biri de antinutrient fitat bileşiğinin parçalanmasıdır. Çoğu LAB'ın fitaz ürettiği ifade edilmektedir. Tahıl fermantasyonu, tahıllardaki fitat içeriğini azaltmak için umut verici bir yöntem olarak düşünülmektedir (Ghamry vd., 2023).

Baumgärtner ve arkadaşlarının 2022 yılında yürüttüğü bir çalışmada 1,3/1,6-beta-glukanlar ve MOS'ların da bulunduğu bir prebiyotik karışımın kültür balık türlerinde takviye olarak kullanılması büyüme performansını ve bağışıklık aktivitesini iyileştirdiği söylenmektedir (Baumgärtner vd., 2022).

Hindistan cevizinde yan ürün olarak karşımıza çıkan kopra unundan elde edilen MOS'lar ile yürütülen başka bir çalışmada *Litopenaeus vannamei* türü karidesine yem katkı maddesi olarak kullanılmıştır. Karidesler 2, 3 ve 4 g MOS ile desteklenmiş diyetlerle beslenmiştir. Tüm diyet grupları arasında MOS ile desteklenmiş diyetlerle beslenen gruplar da büyüme performansları, *Vibrio harveyi*'ye karşı patojen direnci daha iyi durumda olduğu görülmüştür (Rungrasamee vd., 2014).

Mayadan elde edilen mannoprotein preparatlarının prebiyotik özellikleri *L. arabinosus*, *L. brevis* ve *L. fermentum* ile *B. bifidum*, *B. animalis subsp. lactis* için değerlendirilen bir çalışmada MRS ortamına %0.5; %1.0; %1.5 ve %2.0 oranında mannoprotein eklenmiştir. Kontrol olarak ise mannoprotein eklenmemiş MRS ortamı kullanılmıştır. Bakılan konsantrasyonlarda tüm mannoprotein preparatlarının eklenmesinin LAB ve bifidobakterilerin büyümesi üzerinde yararlı bir etkiye sahip olduğu fakat büyümelerinin uyarılma derecesinin preparatın türüne, dozuna ve bakteri suşuna bağlı olduğu gözlemlenmiştir. *S. cerevisiae* biyokütlesinden elde edilen preparatta en etkili büyüme, %1-2 aralığında preparat konsantrasyonlarında *L. arabinosus* ve *B. animalis subsp. lactis* kültürlerinde bulunmuştur. *L. arabinosus* suşu test edilen tüm preparatların varlığında en

etkili büyüme göstermiştir bu nedenle karbon kaynağı olarak mannoproteinlerin kullanımına yönelik bir eğilimi olabilir (Anna vd., 2022).

Yürütülen bu tez çalışmasında biyokütle ile büyüme eğrileri arasında farklılık görünmüştür. Biyokütlenin fazla çıkması aslında yer elması, buğday kepeği gibi kaynakların kompleks yapılar içermesine bağlı olabilir. Bakteriler bu yapıların bir kısmını kullanırken bir kısmı kullanmaz ve kuru ağırlık yani biyokütle artışına sebebiyet verebilirler. Özellikle fermentasyon sırasında üretilen maddeler de kuru ağırlığa neden olabilmektedir. Bunlara ek olarak büyüme eğrisi sadece canlı hücrelerin artmasını tespit etmektedir. Bu yöntem parçalanmış hücre kalıntıları, ekzopolisakkarit gibi salgıları, hücre büyüklüğünü ölçemez. Bu nedenle büyüme eğrisi düşük çıkarken biyokütleler yüksek çıkabilir. Modifiye edilen besiyerleri lif içeren kaynaklardan elde edilmiştir. Bu durum bakterilerin hücre büyüklüğü olarak daha büyük olmasına neden olabilir. Bu da absorbans değerinin değişmemesine ama biyokütlenin yüksek çıkmasına da neden olabilir (Rossi vd., 2005; Ruas-Madiedo vd., 2002; Slavin, 2013). Bunlara ek olarak H1 izolatu büyüme eğrilerinde daha iyi sonuçlar vermiştir fakat bu suş *Enterococcus faecalis* olarak belirlenmiştir. Enterokoklar LAB grubuna aittir ve gıda bozulmaları, fermentasyonlarındaki rolleriyle probiyotik olarak kullanılmaları nedeniyle gıdalarda önemlidirler. Ancak enterokokların kullanım açısından güvenilirliği hakkında endişeler bulunmaktadır. Bir yandan enterokokların yararlı, sağlığı geliştirici etkileri tanımlanmıştır ve bazı probiyotik suşların uzun bir güvenli kullanım geçmişi bulunmaktadır. Bunlara ek olarak, enterokokların fırsatçı patojenler olduğu ve enfeksiyonlarının yaygın bir nedeni olduğu bilinmektedir. Bu nedenle probiyotik olarak kullanılması hakkında soru işaretleri vardır. *Enterococcus faecalis*'in *Lactobacillus*'lara kıyasla MRS'de daha iyi büyüme eğrileri göstermesi *Lactobacillus*'ların büyüme için daha seçici olmalarına bağlanabilir (Franz vd., 2011). Büyüme eğrilerinin *S. cerevisiae*'li ortamlarda düşük gelişim göstermeleri ise maya bulunan ortamların pH değeri genellikle nötr ya da alkali pH'a yönelir. Ancak *Lactobacillus* türleri asidik ortamlarda daha iyi gelişim göstermektedir. Buna ek olarak *Lactobacillus* türlerinin besin gereksinimleri seçici olup maya ile hazırlanan modifiye besiyeri bu gereksinimleri yeterli miktarda sağlamayabilir özellikle karbonhidrat kaynağı eksikse büyüme baskılanabilmektedir. Maya otoklavlandığında ya da yeterince parçalanmadığında içerdikleri amino asitler, vitaminler ve karbon kaynakları bakteriler için erişilebilir olmayabilmektedir (Franz vd., 2011; Jiranek & Henschke, 1993).

Ticari suşlar ve izole edilen bakterilerin enzim taramaları kapsamında amilaz, lipaz, proteaz ve fitaz aktivitelerine sahip olup olmadığına bakılmıştır. Lipaz aktivitesi için tribütrinli agar kullanılmış olup hiçbir suşta lipaz aktivitesi görülmemiştir. Ayrıca biyokütlelerine göre en iyi sonuç veren modifiye besiyerlerinin fermentasyon sıvılarına da kit prosedürleri uygulanmıştır. Modifiye besiyerlerindeki lipaz aktivitesi sonuçlarına göre en iyi sonuç *S.cerevisiae* %10 *S.cerevisiae* 'de görülmüştür.

Tilapia'dan izole edilen LAB'lar ile yürütülen bir çalışmada lipaz aktivitesi; 0.25 mL zeytinyağı, %0.01 $\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}$ ve %0.0001 rhodamin B eklenmiş MRS Agar besiyerinde belirlenmiştir. Pozitif reaksiyonlar pembe-turuncu koloniler şeklinde görülmüştür. İzole edilen LAB bakterilerinin biri hariç tümünde lipaz aktivitesi olduğu belirtilmiştir (Coulibaly vd., 2023).

Tez çalışmamızda amilaz aktiviteleri için nişastalı agar kullanılmıştır. Tüm izolatlar ve ticari suşlarda amilaz aktivitesi olduğu tespit edilmiştir.

Süt, lor ve sığır kolostrumu gibi farklı örneklerden LAB izole edilen bir çalışmada amilaz aktivitesi için bakteri suşları, % 0.25 nişasta ile desteklenmiş modifiye MRS ortamına (% 0.5 pepton, % 0.7 maya özü, % 0.2 NaCl, % 2 nişasta ve % 1.5 agar) ekilmiştir. Bir günlük inkübasyondan sonra iyot damlatılarak bakterilerin etrafındaki berrak zon amilaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. Gözlemlenen maksimum amilaz üretimi *Lactobacillus sp.* tarafından ortalama çapı 1.23 mm şeklinde ifade edilmiştir. Amilolaktik asit bakterileri tahıl bazlı gıdaların, ekşi mayalı çavdar ekmeği gibi fermente gıdaların, ekşi mayalı poğaçaların, alkolsüz içecek üretimi gibi fermente gıdaların geliştirilmesinde önerilebilir. Nişasta ve amilolaktik asit bakterilerinin kombinasyonu, maliyet açısından etkili bir fermentasyon süreci olarak karşımıza çıkmaktadır (Padmavathi vd., 2018).

Topraktan izole edilen bakterilerde amilaz aktivitesi için nişasta hidroliz testi yapılan başka bir çalışmada ise bakteriyel izolatlar nişasta agar ortamına ekilmiştir ve 24-48 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra iyot çözeltisi damlatılmıştır. Amilaz enzim aktivitesi 6 bakteri kolonisinden 3'ünde güçlü olduğu görülmüştür. Tarımsal sanayi atıklarının katı hal fermentasyonu ile amilaz üretimi de ucuz substratlar kullanılarak yapılmış ve uygun substrat olarak buğday kepeği bulunmuştur. Substrat olarak buğday kepeği, pirinç kepeği, patates kabuğu, şeker kamışı gibi farklı tarımsal sanayi atıkları kullanılmıştır. Deney KH_2PO_4 -%0.1, NaCl-%0.25, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -%0.01, CaCl_2 -%0.01 oranında maddeler içeren 10 mL steril sıvı besin ortamı ile 5 g substrat içeren erlenlerde

gerçekleştirilmiş ve izolatlardan 1 mL ekim yapıp 5 gün boyunca 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Katı hal fermentasyonu ile amilaz üretiminde en uygun substrat olarak buğday kepeği bulunmuştur (Ekka & Namdeo, 2018).

Tez çalışmamızda proteaz aktivitesi tespiti için ise skim milk agar kullanılmıştır. Tüm izolatlar ve ticari suşlarda saydam bir zon oluşarak aktivite olduğu görülmüştür. Proteaz aktivitesi için uygulanan kitte ise en iyi sonuç Lsp3’te görülmüştür.

Keçi sütünden izole edilen LAB bakterileri ile yürütülen bir çalışmada proteaz aktivitesini belirlemek için %3 oranında skim milk içeren MRS agar ortamına izole edilen LAB’lar ekilmiş ve 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda laboratuvar kolonileri etrafında net bir bölge ve pıhtılaşma özelliği sergilediği görülmüştür. İzole edilen *Lactobacillus paracasei*’nin proteaz aktivitesine sahip olduğu görülmüştür (Putranto vd., 2021).

Fitaz aktivitesi tespiti için ise sodyum fitatlı besiyeri kullanılmıştır. İzole edilen bakterilerde 2.4 hariç tüm izolatlar ve ticari suşlarda zon oluştuğu görülmüş ve aktivite var olduğu görülmüştür. Uygulanan kitte ise en iyi sonuç Lsp3 %10 buğday kepeği’nde görülmüştür.

Hatay peynirinden izole edilen *L. brevis* ile yürütülen bir çalışmada fitaz aktivitesinin tespiti için izolat, sodyum fitat içeren besiyerinde 37 °C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Mikrobiyal asit üretiminin neden olduğu yanlış pozitif sonuçları ortadan kaldırmak için petri %2 oranında kobalt klorür çözeltisi ile yıkanmıştır. Oda sıcaklığında 5 dakikalık inkübasyonun ardından, kobalt klorür çözeltisi çıkarılmıştır ve daha sonra eşit hacimlerde %6.25 oranında amonyum molibdat çözeltisi ve %0.42 oranında amonyum vanadat çözeltisi içeren bir solüsyon petriye dökülmüştür. 5 dakikalık inkübasyonun ardından amonyum molibdat/amonyum vanadat çözeltisi de çıkarılıp petri fitat hidroliz bölgeleri açısından incelenmiştir. İnkübasyondan sonra *L.brevis*’in, sodyum fitatı hidrolize ederek koloninin etrafında berrak bir bölge oluşturduğu görülmüştür (Sümengen vd., 2012).

Laktik asit üretim tayininde kitte en iyi sonuç 1.4.3 %10 *S.cerevisiae* modifikasyonunda görülmüştür.

Asetik asit üretim tayininde en iyi sonuç *L.plantarum*’da görülmüştür. Modifiye besiyerlerinde ise en iyi sonuç *B.bifidum* %10 *S.cerevisiae*’da görülmüştür.

Bütirik asit; *L.plantarum*, *L. brevis*, *L. bulgaricus*, *L. buchneri*, *L. paracasei* gibi laktik asit bakterileri tarafından üretilmektedir (Cui vd., 2020). Bu tez çalışmasında bütirik asit üretim tayininde en iyi sonuçlar 1.3.1 %5 buğday kepeği ile *L.reuteri* %10 *S.cerevisiae*'da görülmüştür.

İzole edilen bakterilerin ise hizmet alımı yoluyla gen dizilimine bakıldığında H8'in *L. brevis*, H1'in *E. faecalis* ve kalan suşların *L.rhamnosus* olduğu görülmüştür.

Sinbiyotik kullanımında özellikle probiyotik bakterinin prebiyotik maddeye özel seçilmesi önem arz etmektedir. Bakterilerde amilaz, proteaz, fitaz gibi enzimlerin bulunması sinbiyotik maddenin yararlılığını hem insan beslenmesinde hem de yem kullanımında önemli etkiler yaratabilmektedir.

Özetle probiyotik bakteriler ve prebiyotik maddelerin sinbiyotik olarak kullanılması prebiyotik ve probiyotiklerin aktivitelerini arttırıp sağlık, gıda, kozmetik ve yem alanında daha faydalı olması potansiyeli yüksektir. Bu alanlarda kullanımı potansiyeline sahip olmakla beraber kullanımı arttırılmalıdır.

5.2 Öneriler

- Sinbiyotiklerin tedavi aracı olarak kullanılması için sağlık uzmanları tarafından önerilmesi kullanım açısından destek sağlayabilir.
- Sinbiyotiklerin yem alanında kullanımı potansiyel olarak değerlendirilmeli ve bu konuda çiftçilere destek sağlanmalıdır.
- Sinbiyotiklerdeki prebiyotik maddelerin özellikle yan ürünlerle desteklenmesi maliyet açısından üreticiye pozitif olarak yansıyabilir.
- Sinbiyotiklerin kullanımını yaygınlaştırmak için bireylere daha çok tanıtılmalı ve kullanımı teşvik edilmelidir.
- Sinbiyotiklerin insan üzerindeki etki mekanizmalarının tam olarak belirlenebilmesi için daha çok araştırma yapılmalıdır.

KAYNAKÇA

- Abdelsattar, M. M., Rashwan, A. K., Younes, H. A., Abdel-Hamid, M., Romeih, E., Mehanni, A. H. E., Vargas-Bello-Pérez, E., Chen, W., & Zhang, N. (2022). An updated and comprehensive review on the composition and preservation strategies of bovine colostrum and its contributions to animal health. *Animal Feed Science and Technology*, 291. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115379>
- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152. <https://doi.org/10.1016/J.JSPS.2012.05.002>
- Al-Sheraji, S. H., Ismail, A., Manap, M. Y., Mustafa, S., Yusof, R. M., & Hassan, F. A. (2013). Prebiotics as functional foods: A review. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1542-1553. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.08.009>
- Anna, B. W., Pavol, F., Paulina, C., Dominika, P., Alicja, S., Katarzyna, P., & Monika, J. (2022). Antimicrobial and prebiotic activity of mannoproteins isolated from conventional and nonconventional yeast species—the study on selected microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(12). <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03448-5>
- Arslan, A., Kaplan, M., Duman, H., Bayraktar, A., Ertürk, M., Henrick, B. M., Frese, S. A., & Karav, S. (2021). Bovine Colostrum and Its Potential for Human Health and Nutrition. *Frontiers in Nutrition*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.651721>
- Banakar, M., Pourhajibagher, M., Etemad-Moghadam, S., Mehran, M., Yazdi, M. H., Haghgoo, R., Alaeddini, M., & Frankenberger, R. (2023). Antimicrobial Effects of Postbiotic Mediators Derived from *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus reuteri* on *Streptococcus mutans*. *Frontiers in Bioscience - Landmark*, 58(5). <https://doi.org/10.31083/j.fbl2805088>
- Baumgärtner, S., James, J., & Ellison, A. (2022). The supplementation of a prebiotic improves the microbial community in the gut and the skin of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture Reports*, 25. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101204>
- Belicová, A., Mikulášová, M., & Dušínský, R. (2013). Probiotic potential and safety properties of *Lactobacillus plantarum* from Slovak Bryndza cheese. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/760298>
- Beveridge, T. J. (2001). Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic and Histochemistry*, 76(3), 111-118. <https://doi.org/10.1080/bih.76.3.111.118>
- Bhutto, R. A., Bhutto, N. ul ain H., Mahar, H., Khanal, S., Wang, M., Iqbal, S., Fan, Y., & Yi, J. (2025). Recent trends in co-encapsulation of probiotics with prebiotics and their applications in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 156. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104829>
- Bouhnik, Y., Raskine, L., Simoneau, G., Vicaut, E., Neut, C., Flourié, B., Brouns, F., & Bornet, F. R. (2004). The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacteria in healthy humans: a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose-response relation study 1-3. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 1658-1664.
- Carlson, J. L., Erickson, J. M., Lloyd, B. B., & Slavin, J. L. (2018). Health effects and sources of prebiotic dietary fiber. *Current Developments in Nutrition*, 2(3). <https://doi.org/10.1093/cdn/nzy005>
- Chen, B., Tang, G., Guo, W., Lei, J., Yao, J., & Xu, X. (2021). Detection of the core bacteria in colostrum and their association with the rectal microbiota and with milk composition in two dairy cow farms. *Animals*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/ani11123363>
- Cloetens, L., Swennen, K., De Preter, V., Broekaert, W. F., Courtin, C. M., Delcour, J. A., Rutgeerts, P., & Verbeke, K. (2008). Effect of arabinoxylo-oligosaccharides on proximal gastrointestinal motility and digestion in healthy volunteers. *the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism*, 3(5), 220-225. <https://doi.org/10.1016/j.eclnm.2008.05.008>
- Conrads, G., Bockwoldt, J. A., Kniebs, C., & Abdelbary, M. M. H. (2018). Commentary: Health-associated niche inhabitants as oral probiotics: The case of *Streptococcus dentisani*. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00340>

- Coulibaly, W. H., Kouadio, N. R., Camara, F., Diguță, C., & Matei, F. (2023). Functional properties of lactic acid bacteria isolated from Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Ivory Coast. *BMC Microbiology*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02899-6>
- Cowan, C. S. M., Callaghan, B. L., & Richardson, R. (2016). The effects of a probiotic formulation (*Lactobacillus rhamnosus* and *L. Helveticus*) on developmental trajectories of emotional learning in stressed infant rats. *Translational Psychiatry*, 6(5). <https://doi.org/10.1038/tp.2016.94>
- Cui, Y., Miao, K., Niyaphorn, S., & Qu, X. (2020). Production of gamma-aminobutyric acid from lactic acid bacteria: A systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/ijms21030995>
- Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S. J., Berenjian, A., & Ghasemi, Y. (2019). Prebiotics: Definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. *Foods*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/foods8030092>
- Dunne Colum, Murphy Lisa, & Thornton Gerardine. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin correlation with in vivo findings1 4. *American Society for Clinical Nutrition*, suppl(73), 386-392.
- Ekka, A., & Namdeo, N. (2018). Screening, Isolation and Characterization of Amylase Producing Bacteria and optimization for Production of Amylase. *IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 4(2), 50-56. <https://doi.org/10.9790/264X-0402015056>
- El-Loly, M. M. (2022). Colostrum ingredients, its nutritional and health benefits - an overview. *Clinical Nutrition Open Science*, 44, 126-143. <https://doi.org/10.1016/j.nutos.2022.07.001>
- Erkan, K. (2014). *Mikrobiyal Fitaz Üretimine ve Aktivitesine Etkili Parametrelerin Belirlenmesi*. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- FAO, & WHO. (2001). *Probiotics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation*.
- Fehily, S. R., Basnayake, C., Wright, E. K., Yao, C. K., Godsell, J., Gibson, P. R., & Kamm, M. A. (2024). Probiotics: are they beneficial? *Internal Medicine Journal*, 54(6), 861-870. <https://doi.org/10.1111/imj.16388>
- Feng, T., & Wang, J. (2020). Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review. *Gut Microbes*, 12(1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1801944>
- Fijan, S. (2014). Microorganisms with claimed probiotic properties: An overview of recent literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(5), 4745-4767. <https://doi.org/10.3390/ijerph110504745>
- Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Muñoz-Quezada, S., & Gil, A. (2013). Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*, 109(SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1017/S0007114512004011>
- Franz, C. M. A. P., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., & Gálvez, A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 151(2), 125-140. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.014>
- Ganaie, M. A., Soni, H., Naikoo, G. A., Santos Oliveira, L. T., Rawat, H. K., Mehta, P. K., & Narain, N. (2017). Screening of low cost agricultural wastes to maximize the fructosyltransferase production and its applicability in generation of fructooligosaccharides by solid state fermentation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 118, 19-26. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2017.01.006>
- Gasbarrini, G., Bonvicini, F., & Gramenzi, A. (2016). Probiotics History. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 50, 116-119. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000697>
- Ghamry, M., Zhao, W., & Li, L. (2023). Impact of *Lactobacillus apis* on the antioxidant activity, phytic acid degradation, nutraceutical value and flavor properties of fermented wheat bran, compared to *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum*. *Food Research International*, 163. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112142>
- Gibson, G. R. (2004). Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). *Clinical Nutrition*, Supplement, 1(2), 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2004.09.005>

- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14(8), 491-502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Goldin, B. R., Gorbach, S. L., Barakat, S., Gualtieri, L., & Salminen, S. (1992). Survival of *Lactobacillus* Species (Strain GG) in Human Gastrointestinal Tract. *Digestive Diseases and Sciences*, 37(1), 121-128.
- Gopal, P. K., & Gill, H. S. (2000). Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum. *British Journal of Nutrition*, 84(SUPPL. 1), 69-74. <https://doi.org/10.1017/s0007114500002270>
- Guarner, F., Sanders, M. E., Szajewska, H., Cohen, H., Eliakim, R., Herrera-Deguisse, C., Karakan, T., Merenstein, D., Piscocya, A., Ramakrishna, B., Salminen, S., & Melberg, J. (2024). World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: Probiotics and Prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 58(6), 533-553. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000002002>
- Haghshenas, B., Kiani, A., Mansoori, S., Mohammadi-noori, E., & Nami, Y. (2023). Probiotic properties and antimicrobial evaluation of silymarin-enriched *Lactobacillus* bacteria isolated from traditional curd. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37350-3>
- Homayoni Rad, A., Mehrabany, E. V., Alipoor, B., Mehrabany, L. V., & Javadi, M. (2012). Do probiotics act more efficiently in foods than in supplements? *Nutrition*, 28(7-8), 733-736. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2012.01.012>
- Iraporda, C., Rubel, I. A., Manrique, G. D., & Abraham, A. G. (2019). Influence of inulin rich carbohydrates from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers on probiotic properties of *Lactobacillus* strains. *LWT - Food Science and Technology*, 101, 738-746. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.074>
- ISAPP. (2019). *The ISAPP quick guide to probiotics for health professionals: History, efficacy, and safety A resource prepared by the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics*.
- Jin, S. W., Lee, G. H., Jang, M. J., Hong, G. E., Kim, J. Y., Park, G. D., Jin, H., Kim, H. S., Choi, C. Y., Choi, J. H., Lee, S. G., Jeong, H. G., & Hwang, Y. P. (2020). Lactic acid bacteria ameliorate diesel exhaust particulate matter-exacerbated allergic inflammation in a murine model of asthma. *Life*, 10(11), 1-16. <https://doi.org/10.3390/life10110260>
- Jiranek, V., & Henschke, P. A. (1993). Yeasts-metabolism of nitrogen compounds in Wine. İçinde *Microbiology and Biotechnology* (ss. 77-164). The Australian Wine Research Institute. <https://www.researchgate.net/publication/294697283>
- Keskin, E. (2019). *Bazı Mikroorganizmaların Ürettiği Lipaz Enziminin Optimizasyon Ve Karakterizasyonu*. Fen Bilimleri Enstitüsü Hacı Bektaş Veli Üniversitesi.
- Khan, T. S., Akram, N., Faisal, Z., Saeed, F., Rasheed, A., Ahmed, F., & Afzaal, M. (2024). Bovine colostrum: Therapeutic potential and clinical evidence. *International Dairy Journal*, 157. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2024.105996>
- Kırmacı, H. (2010). *Geleneksel Urfa Peynirinde Yer Alan Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Moleküler Karakterizasyonu ve Starter Kültür Olarak Kullanım Olanakları*. Fen Bilimleri Enstitüsü Harran Üniversitesi.
- Kijroongrojana, K., Reanmongkol, W., Thammarutwasik, P., Hongpattarakere, T., Chantachum, S., Itharat, A., Tewtrakul, S., & Ooraikul, B. (2009). Prebiotics-A Review. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 31(4), 401-408. <https://www.researchgate.net/publication/279902625>
- Kowalczyk, M., Radziwill-Bienkowska, J. M., Marć, M. A., Jastrzab, R., Mytych, J., Siedlecki, P., & Szczepankowska, A. K. (2024). Screening for probiotic properties and potential immunogenic effects of lactobacilli strains isolated from various food products. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1430582>
- Lima, S. F., Teixeira, A. G. V., Lima, F. S., Ganda, E. K., Higgins, C. H., Oikonomou, G., & Bicalho, R. C. (2017). The bovine colostrum microbiome and its association with clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 100(4), 3031-3042. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11604>

- Louis, P., Flint, H., & Michel, C. (2016). How to Manipulate the Microbiota: Prebiotics. İçinde A. Schwiertz (Ed.), *Microbiota of Human Body* (C. 902, ss. 119-142). Springer. <https://www.springer.com/series/5584>
- Markowiak, P., & Ślizewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
- Mazziotta, C., Tognon, M., Martini, F., Torreggiani, E., & Rotondo, J. C. (2023). Probiotics Mechanism of Action on Immune Cells and Beneficial Effects on Human Health. *Cells*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/cells12010184>
- Meruvu, H., & Harsa, S. T. (2023). Lactic acid bacteria: isolation–characterization approaches and industrial applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(26), 8337-8356. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2054936>
- Mishra, V., & Prasad, D. N. (2005). Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 103(1), 109-115. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.047>
- Mounir, M., Ibjibjen, A., Farih, K., Rabetafika, H. N., & Razafindralambo, H. L. (2022). Synbiotics and Their Antioxidant Properties, Mechanisms, and Benefits on Human and Animal Health: A Narrative Review. *Biomolecules*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/biom12101443>
- Mussatto, S. I., & Mancilha, I. M. (2007). Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, 68(3), 587-597. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.12.011>
- NCCLS. (2012). *M07-A9: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*. www.clsi.org.
- Nguyen, T. T., Nguyen, P. T., Pham, M. N., Razafindralambo, H., Hoang, Q. K., & Nguyen, H. T. (2022). Synbiotics: a New Route of Self-production and Applications to Human and Animal Health. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 14(5), 980-993. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09960-2>
- Oelschlaeger, T. A. (2010). Mechanisms of probiotic actions - A review. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(1), 57-62. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.08.005>
- Özyurt, H., & Ötleş, S. (2014). Prebiyotikler: Metabolizma İçin Önemli Bir Gıda Bileşeni. *Academic Food Journal*, 12(1), 115-123. <http://www.academicfoodjournal.com>
- Padmavathi, T., Bhargavi, R., Priyanka, P. R., Niranjana, N. R., & Pavitra, P. V. (2018). Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its partial purification. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 357-362. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.03.005>
- Pan, X., Chen, F., Wu, T., Tang, H., & Zhao, Z. (2009). The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food Control*, 20(6), 598-602. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.08.019>
- Pandey, K. R., Naik, S. R., & Vakil, B. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7577-7587. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1921-1>
- Parhi, P., Liu, S. Q., & Choo, W. S. (2024). Synbiotics: Effects of prebiotics on the growth and viability of probiotics in food matrices. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 32. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2024.100462>
- Pereira, D. I. A., & Gibson, G. R. (2002). Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4689-4693. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4689-4693.2002>
- Peruzzolo, M., Ceni, G. C., Junges, A., Zeni, J., Cansian, R. L., & Backes, G. T. (2025). Probiotics: Health benefits, microencapsulation, and viability, combination with natural compounds, and applications in foods. *Food Bioscience*, 66. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.106253>
- Putranto, W. S., Mustopa, A. Z., Kusumawati, A., & Prastyowati, A. (2021). The Purification Of Rennin-Like Protease From *Lactobacillus Paracasei* Isolated From Ettawa Goat Milk. *Annales Bogorienses*, 24(2), 74. <https://doi.org/10.14203/ann.bogor.2020.v24.n2.74-80>

- Qadi, W. S. M., Mediani, A., Kasim, Z. M., Misnan, N. M., Sani, N. A., & Jamar, N. H. (2023). Biological Characterization and Metabolic Variations among Cell-Free Supernatants Produced by Selected Plant-Based Lactic Acid Bacteria. *Metabolites*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/metabo13070849>
- Ramani, A., Taherabbas, S., & Manik, S. (2024). Bovine colostrum as a promising nutraceutical: a systematic review. *Sustainable Food Technology*, 2(3), 531-547. <https://doi.org/10.1039/d3fb00256j>
- Reiner K. (2010). Catalase Test Protocol. İçinde *American Society for Microbiology*. www.asmscience.org
- Rossi, M., Corradini, C., Amaretti, A., Nicolini, M., Pompei, A., Zanoni, S., & Matteuzzi, D. (2005). Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: A comparative study of pure and fecal cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 6150-6158. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.6150-6158.2005>
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., & Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12, 163-171.
- Rungrasamee, W., Kingcha, Y., Srimarut, Y., Maibunkaew, S., Karoonuthaisiri, N., & Visessanguan, W. (2014). Mannooligosaccharides from copra meal improves survival of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after exposure to *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*, 434, 403-410. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.08.032>
- Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M. M., Sanders, M. E., Shamir, R., Swann, J. R., Szajewska, H., & Vinderola, G. (2021). The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 18(9), 649-667. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6>
- Saville, S. H., Younes, J. A., Paraskevagos, G., & Venema, K. (2025). The prebiotic landscape: history, health and physiological benefits, and regulatory challenges - an IPA perspective part 1. *Beneficial microbes*, 16(1), 1-33. <https://doi.org/10.1163/18762891-bja00056>
- Shijila Rani, A. S., Babu, S., Anbukumaran, A., Veeramani, S., Ambikapathy, V., Gomathi, S., & Senthilkumar, G. (2021). Prospective Approaches of *Pseudonocardia alaniiphila* Hydrobionts for *Litopenaeus vannamei*. *Advances in Probiotics*, 327-348. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822909-5.00021-6>
- Shokryazdan, P., Faseleh Jahromi, M., Liang, J. B., & Ho, Y. W. (2017). Probiotics: From Isolation to Application. *Journal of the American College of Nutrition*, 36(8), 666-676. <https://doi.org/10.1080/07315724.2017.1337529>
- Singarayar, M. S., Chandrasekaran, A., Balasundaram, D., Veerasamy, V., Neethirajan, V., & Thilagar, S. (2024). Prebiotics: Comprehensive analysis of sources, structural characteristics and mechanistic roles in disease regulation. *Microbial Pathogenesis*, 197. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.107071>
- Singh, P., Gupta, S. K., Kundu, A., Grover, M., & Saha, S. (2025). Role of fructooligosaccharides in promoting beneficial gut bacteria: A Prebiotic perspective. *Food Bioscience*, 63. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.105726>
- Slavin, J. (2013). Fiber and prebiotics: Mechanisms and health benefits. *Nutrients*, 5(4), 1417-1435. <https://doi.org/10.3390/nu5041417>
- Suez, J., Zmora, N., Segal, E., & Elinav, E. (2019). The pros, cons, and many unknowns of probiotics. *Nature Medicine*, 25(5), 716-729. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0439-x>
- Sümengen, M., Dinçer, S., & Kaya, A. (2012). Phytase production from *Lactobacillus brevis*. *Turkish Journal of Biology*, 36(5), 533-541. <https://doi.org/10.3906/biy-1111-2>
- Swanson, K. S., Gibson, G. R., Hutkins, R., Reimer, R. A., Reid, G., Verbeke, K., Scott, K. P., Holscher, H. D., Azad, M. B., Delzenne, N. M., & Sanders, M. E. (2020). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 17(11), 687-701. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0344-2>

- Talib, N., Mohamad, N. E., Yeap, S. K., Hussin, Y., Mubin Aziz, M. N., Masarudin, M. J., Sharifuddin, S. A., Hui, Y. W., Ho, C. L., & Alitheen, N. B. (2019). Isolation and characterization of *Lactobacillus* spp. From kefir samples in Malaysia. *Molecules*, 24(14). <https://doi.org/10.3390/molecules24142606>
- Taylor, W., & Achanzar, D. (1972). Catalase Test as an Aid to the Identification of Enterobacteriaceae. *Applied Microbiology American Society for Microbiology*, 24(1), 58-61.
- Thairu, Y., Usman, Y., & Nasir, I. (2014). Laboratory perspective of gram staining and its significance in investigations of infectious diseases. *Sub-Saharan African Journal of Medicine*, 1(4), 168. <https://doi.org/10.4103/2384-5147.144725>
- Tunalı, Y. (2021). *Farmasötik Mikrobiyoloji ve İmmünoloji Uygulamaları* (1. bs). Dora yayıncılık.
- Valcheva, R., & Dieleman, L. A. (2016). Prebiotics: Definition and protective mechanisms. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 30(1), 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2016.02.008>
- Van Hese, I., Goossens, K., Ampe, B., Haegeman, A., & Opsomer, G. (2022). Exploring the microbial composition of Holstein Friesian and Belgian Blue colostrum in relation to the transfer of passive immunity. *Journal of Dairy Science*, 105(9), 7623-7641. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-21799>
- Vijayaraghavan P, & Vincent S. (2013). A simple method for the detection of protease activity on agar plates using bromocresolgreen dye. *J Biochem Tech*, 3(4), 628-630.
- Wang, C. Y., Lin, P. R., Ng, C. C., & Shyu, Y. T. (2010). Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe*, 16(6), 578-585. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.10.003>
- Wang, Y., Wu, Y., Wang, Y., Xu, H., Mei, X., Yu, D., Wang, Y., & Li, W. (2017). Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/nu9050521>
- Wei, L., Wang, B., Bai, J., Zhang, Y., Liu, C., Suo, H., & Wang, C. (2024). Postbiotics are a candidate for new functional foods. *Food Chemistry: X*, 23. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101650>
- Williams, N. T. (2010). Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 67(6), 449-458. <https://doi.org/10.2146/ajhp090168>
- Wilson, B., & Whelan, K. (2017). Prebiotic inulin-type fructans and galacto-oligosaccharides: definition, specificity, function, and application in gastrointestinal disorders. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 32, 64-68. <https://doi.org/10.1111/jgh.13700>
- Xie, X. lan, Zhang, G., Gao, H. hui, Deng, K. xin, Chu, Y. feng, Wu, D. yan, Yan, S. ying, Zhou, J., & Zhao, J. (2021). Analysis of bovine colostrum microbiota at a dairy farm in Ningxia, China. *International Dairy Journal*, 119. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.104984>
- Yasmin, I., Saeed, M., Khan, W. A., Khaliq, A., Chughtai, M. F. J., Iqbal, R., Tehseen, S., Naz, S., Liaqat, A., Mehmood, T., Ahsan, S., & Tanweer, S. (2020). In vitro probiotic potential and safety evaluation (Hemolytic, cytotoxic activity) of bifidobacterium strains isolated from raw camel milk. *Microorganisms*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030354>
- Zarei, O., Dastmalchi, S., & Hamzeh-Mivehroud, M. (2016). A Simple and Rapid Protocol for Producing Yeast Extract from *Saccharomyces cerevisiae* Suitable for Preparing Bacterial Culture Media. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 15(4), 907. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5316271/>
- Zawistowska-Rojek, A., & Tyski, S. (2018). Are probiotic really safe for humans? *Polish Journal of Microbiology*, 67(3), 251-258. <https://doi.org/10.21307/pjm-2018-044>
- Żółkiewicz, J., Marzec, A., Ruszczyński, M., & Feleszko, W. (2020). Postbiotics—a step beyond pre-and probiotics. *Nutrients*, 12(8), 1-17. <https://doi.org/10.3390/nu12082189>

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Melisa Ayhan

Yabancı Dil: İngilizce

Eğitim Bilgileri

2022, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü

2018, Şehit Kemal Mutlu Fen Lisesi

Mesleki Deneyim

2022-23, Diyetisyen, Özel sektör, Ankara

Görev Aldığı Projeler

Bilimsel araştırma projesi, BGT-2024-2459, Farklı formülasyonlarla elde edilmiş sinbiyotiklerin biyolojik aktiviteleri, Bursiyer, (20.05.2024-20.10.2025)