



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKER BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ**

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**ISIL İŞLEM VE ULTRASES KULLANIMI İLE *LACTOBACILLUS*
ACIDOPHILUS'TAN POSTBİYOTİK ELDESİ**

**DOĞUKAN YILTAN MÜLDÜR
YÜKSEK LİSANS TEZİ**



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADANA ALPARSLAN TÜRKER BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ**

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**ISIL İŞLEM VE ULTRASES KULLANIMI İLE *LACTOBACILLUS*
ACIDOPHILUS'TAN POSTBİYOTİK ELDESİ**

**DOĞUKAN YILTAN MÜLDÜR
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
PROF. DR. ZAFER ERBAY**

**II. DANIŞMAN
DOÇ. DR. ECEM AKAN**

ADANA, 2024

JÜRİ ONAY SAYFASI

ISIL İŞLEM VE ULTRASES KULLANIMI İLE *LACTOBACILLUS* *ACIDOPHILUS*'TAN POSTBİYOTİK ELDESİ

Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında 21801001010 numaralı Doğukan Yılmaz MÜLDÜR tarafından ilgili yönetmeliklerin belirlediği şartlar doğrultusunda tamamlanan Yüksek Lisans aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği’nin ilgili maddeleri uyarınca onaylanmıştır.

Doç. Dr. İsim SOYİSİM
Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Zafer ERBAY
Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Zafer ERBAY
Danışman

Doç. Dr. Ecem AKAN
İkinci Danışman

Tez Jürisi

Prof. Dr. Zafer ERBAY
Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi

Doç. Dr. Oktay YERLİKAYA
Ege Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Mithat KURBAN
Hakkari Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi

05 / 08 / 2024

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak, bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın hazırladığım bu tez çalışmada;

Bu tezin özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin akademik kurallara ve etik davranışa uygun olarak elde edilerek sunulduğunu beyan ederim. Ayrıca, tez kapsamında bu kuralların ve davranışların gerektirdiği şekilde bu çalışmaya özgün olmayan tüm veri ve bilgiler için bilimsel etik ve gelenek çerçevesinde kaynak gösterdiğimi; bu kaynakları da kaynakçada belirttiğimi beyan ederim. Çalışmam ile ilgili yaptığım beyana aykırı bir durum saptanması halinde tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

.../.../20..

[İmza]

Doğukan Yıltan MÜLDÜR

ÖZET

ISIL İŞLEM VE ULTRASES KULLANIMI İLE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*'TAN POSTBİYOTİK ELDESİ

Doğukan Yıltan MÜLDÜR

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Zafer ERBAY

II. Danışman: Doç. Dr. Ecem AKAN

Ağustos 2024, 114 sayfa

Probiyotikler, yeterli miktarda alındığında, konakçıya sağlık yararları sağlayan canlı mikroorganizmalardır. Ancak bu mikroorganizmaların canlı olmalarından kaynaklanan depolama sorunları ve sağlık açısından teorik endişelerinden dolayı bu mikroorganizmaların inaktivasyonu ile elde edilmiş postbiyotikler ile alakalı çalışmalar yapılmış ve postbiyotiklerin, probiyotiklerin etki ettikleri yararları taklit edebilecekleri görülmüştür.

Bu tez çalışmasında, seçilmiş olan probiyotik mikroorganizmanın (*Lactobacillus acidophilus*) ısıl işlem ve ultrases yöntemleriyle inaktivasyonunun postbiyotik özellikleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Isıl işlem ile 16 farklı sıcaklık-süre koşulunda (65 °C-95 °C sıcaklık ve 5-90 dakika aralıkları) postbiyotikler üretilmiş ve tüm ısıl işlem koşullarında probiyotiklerin inaktive edildiği saptanmıştır. Sabit frekansta (20 kHz) ultrases işlemi ile farklı genlik (98 µm-320 µm aralığı) ve sürelerdeki (15-60 dakika aralığı) işlemlerin probiyotiklerin inaktivasyonunda etkili olduğu belirlenirken, bütün koşullarda inaktivasyon sağlanamamıştır. Ultrases işlemi ile 98 µm'de 30, 45 ve 60 dk, 172 µm'de 30, 45 ve 60 dk, 246 µm'de 45 ve 60 dk ile 320 µm'de 60 dk genlik/süre kombinasyonlarında probiyotik inaktivasyonu sağlanabilirken, yüksek genliklerdeki ultrases işlemlerine kıyasla düşük genliklerde inaktivasyonun daha etkili olduğu görülmüştür.

Üretilmiş olan postbiyotiklerin probiyotikler üzerinde geliştirici aktiviteleri olup olmadığının incelenebilmesi için *Lacticaseibacillus casei* bakterisi ile *Bifidobacterium* kültür karışımı probiyotik ortamı olarak seçilmiştir. Isıl işlemle inaktive edilen postbiyotiklerin probiyotik geliştirici aktivitesi, ultrases ile inaktive edilen postbiyotiklere kıyasla daha yüksek

bulunmuş, postbiyotik ilavesinin özellikle *L. casei* üzerinde etkili olduğu ve probiyotik sayısının belirgin bir şekilde arttığı tespit edilmiştir (10,77 kata kadar artış). Isıl işleme üretilen postbiyotikler, *Bifidobacterium* kültüründe ise 3,54 kata kadar artış sağlamıştır. Ultrases ile üretilen postbiyotiklerde ise üretim koşuluna bağlı değişmekle beraber çok düşük düzeylerde artışlar (%0,40) veya kimi durumlarda ise azalmalar (-%0,23) görülmüştür. Isıl işlemle düşük sıcaklık ve kısa sürede elde edilen postbiyotiklerin antimikrobiyal aktivitesinin, ultrases ile üretilen postbiyotiklerin antimikrobiyal aktivitesine kıyasla daha yüksek olduğu ve *E. coli* üzerinde %14,58, *E. faecalis* üzerinde ise %8,37 oranında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Postbiyotik üretiminde sıcaklık ve sürenin artması ile antimikrobiyal aktivitenin düştüğü gözlemlenmiştir. Ultrases ile üretilen postbiyotiklerin *E. coli* ve *E. faecalis*'e karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivitenin ise sırasıyla %10,04 ve %3,96 düzeylerinde azalışa sebep olduğu saptanmıştır. Ayrıca, her iki inaktivasyon yöntemi ile üretilmiş olan postbiyotiklerin, probiyotik ortamına ilave edilmesi durumunda, ortamdaki kısa zincirli yağ asidi üretimini belirgin şekilde artırdığı gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: İnaktivasyon, Mikrobiyota, Mikroorganizma, Postbiyotik, Probiyotik

ABSTRACT

EXTRACTION OF POSTBIOTICS FROM *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* BY USING HEAT TREATMENT AND ULTRASOUND

Doğukan Yıltan Müldür

M.Sc., Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Zafer ERBAY

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ecem AKAN

August 2024, 114 pages

Probiotics are microorganisms that provide health benefits to the host when taken in sufficient amounts in viable form. However, due to storage problems and theoretical health concerns arising from the fact that these microorganisms are alive, studies have been conducted on postbiotics obtained by inactivating these microorganisms and it has been observed that postbiotics can mimic the benefits that probiotics provide.

In this thesis study, the effects of inactivating the selected probiotic microorganism (*Lactobacillus acidophilus*) using thermal and ultrasound treatment on postbiotic properties were examined. Postbiotics were produced under 16 different temperature-duration conditions (65 °C-95 °C temperature and 5-90 minutes) during thermal treatment, and it was determined that probiotics were inactivated under all thermal treatment conditions. It was found that ultrasound treatment at a constant frequency (20 kHz) with varying amplitude (98 µm-320 µm range) and duration (15-60 minutes range) was effective in the inactivation of probiotics, though inactivation was not achieved under all conditions. Probiotic inactivation was achieved at amplitude/duration combinations of 98 µm at 30, 45, and 60 minutes, 172 µm at 30, 45, and 60 minutes, 246 µm at 45 and 60 minutes, and 320 µm at 60 minutes during ultrasound treatment, and it was observed that inactivation was more effective at lower amplitudes compared to higher amplitudes.

To investigate whether the produced postbiotics have enhancing activities on probiotics, a probiotic environment consisting of *Lacticaseibacillus casei* and a *Bifidobacterium culture* mixture was selected. The probiotic-enhancing activity of the

postbiotics which were inactivated by thermal treatment was found to be higher activity compared to those inactivated by ultrasound. It was observed that, with the addition of postbiotics, inactivated by thermal treatment, particularly affecting *L. casei* and significantly increasing the probiotic count (up to 10.77-fold increase). The postbiotics produced by thermal treatment also provided up to a 3.54-fold increase in the *Bifidobacterium* culture. However, with postbiotics produced by ultrasound, depending on the production conditions, very low levels of increase (0.40%) or even decreases (-0.23%) were observed. It was determined that the antimicrobial activity of postbiotics produced at low temperature and short duration during thermal treatment provide higher activity compared to the antimicrobial activity of postbiotics produced by ultrasound, causing a reduction of 14.58% on *E. coli* and 8.37% on *E. faecalis*. It was observed that antimicrobial activity decreased with increasing temperature and duration during postbiotic production. The antimicrobial activity of postbiotics produced by ultrasound caused a reduction of 10.04% on *E. coli* and 3.96% on *E. faecalis*. Additionally, it was observed that when postbiotics produced by both inactivation methods were added to the probiotic environment, the production of short-chain fatty acids in the environment was significantly increased.

Keywords: Inactivation, Microbiota, Microorganisms, Postbiotic, Probiotic



İthaf

Kıymetli Aileme

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın tamamlanması sürecinde değerli katkıları olan birçok kişiye teşekkür etmek isterim.

Öncelikle, bu tezin hazırlanmasında rehberlik eden danışman hocam Prof. Dr. Zafer Erbay'a içten teşekkürlerimi sunarım. Bilgisi, sabrı ve sürekli desteği olmasaydı, bu tez bu şekilde tamamlanamazdı. İkinci danışman hocam Doç Dr. Ecem Akan'a da teşekkür ederim.

Ayrıca, akademik yolculuğumda beni destekleyen diğer hocalarım Dr. Sevgin Dıblan, Dr. Pelin Salum'a ve doktora öğrencisi Ceren Ilgaz'a da teşekkür ederim. Onların değerli önerileri ve motivasyonları, bu çalışmanın gelişiminde büyük önem taşımıştır.

Tez sürecinde yanımda olan sevgili ekip arkadaşım Nimet Marsak'a özel bir teşekkür etmek istiyorum. Birlikte çalışmak ve fikir alışverişinde bulunmak benim için büyük bir zenginlikti. Ekip ruhu ve iş birliği sayesinde bu süreç daha verimli geçti.

Sevgili arkadaşlarım Melisa Özpolat, Çağla Ulubaş, Ozan Kaya, Evrim Gök Kaya, Hüseyin Selçuk Bayar, Duran Akkanoğlu, Münevver Akkanoğlu ve Ali Arman Turan'a da teşekkür ederim. Onların destekleri moral motivasyonumun yüksek tutulmasında büyük rol oynadı.

Son olarak, bu süreçte yanımda olan, beni her zaman cesaretlendiren ve sevgisini esirgemeyen sevgili annem Ayla Müldür'e ve babam Yusuf Can Müldür'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezde doğrudan veya dolaylı olarak emeği geçen, destek olan herkese teşekkür ederim.

Bu tez 122Z351 projesi numarası ile TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Destekleri ve katkıları için TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

JÜRİ ONAY SAYFASI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANNAMESİ	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
<i>İthaf</i>	vii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xii
TABLO LİSTESİ	xiii
KISALTMALAR	xv
SEMBOLLER	xvi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. Terminolojiler	5
2.1.1. Paraprobiyotik	6
2.1.2. Postbiyotikler	7
2.1.3. Psikoparaprobiyotikler	9
2.1.4. Prebiyotikler ve Simbiyoz	9
2.2. İnaktivasyon Yöntemleri	9
2.2.1. Isıl İşlem Yöntemi ile İnaktivasyon	10
2.2.2. Ultrases Yöntemi ile İnaktivasyon	12
2.3. Probiyotikler ve Kültür Ortamları	14
2.3.1. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	14
2.3.2. <i>Lactocaseibacillus casei</i>	15
2.3.3. <i>Bifidobacterium longum</i>	16
2.4. Patojenler ve Postbiyotiklerin Antimikrobiyal Etkileri	18
2.4.1. <i>Escherichia coli</i>	18
2.4.2. <i>Enterococcus faecalis</i>	19
2.5. Yapılan Çalışmalar	21
2.5.1. Paraprobiyotik ve Postbiyotik ile İlgili Yapılan Çalışmalar	21
2.5.2. <i>Lactobacillus</i> Suşları ile Yapılan Çalışmalar	25
3. MATERYAL VE METOT	29
3.1. Materyal	29
3.2. Metot	30

3.2.1.	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5'in Aktifleştirilmesi	30
3.2.1.1.	Seyreltme Düzeyinin Belirlenmesi	30
3.2.1.2.	Çift Katman Agar Dökümü	30
3.2.1.3.	Anaerobic Jar ve Anaerobic Cult Kullanımı	30
3.2.1.4.	Başlangıç Probiyotik Miktarının Arttırılması	31
3.2.1.5.	Laktoz İlavesi	31
3.2.1.6.	Spesifikasyona Uygun Uygulama	31
3.2.2.	Isıl İşlem ile İnaktivasyon	32
3.2.3.	Ultrases ile İnaktivasyon	33
3.2.4.	Probiyotik Geliştirici Aktivite	34
3.2.5.	Antimikrobiyal Aktivite	35
3.2.6.	Kısa Zincirli Yağ Asidi	36
3.2.7.	İstatistiksel Analizler ve Değerlendirme	37
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	38
4.1.	İnaktivasyon Yöntemlerinin Probiyotikler Üzerine Etkisi	38
4.1.1.	Isıl İşlem ile İnaktivasyon Yönteminin Probiyotikler Üzerine Etkisi	38
4.1.2.	Ultrases ile İnaktivasyon Yönteminin Probiyotikler Üzerine Etkisi	40
4.2.	Postbiyotiklerin Probiyotik Geliştirici Aktiviteleri	49
4.2.1.	<i>L. casei</i> 431'in ve <i>Bifidobacterium</i> kültürünün Aktifleştirilmesi	49
4.2.2.	Isıl İşleme Maruz Kalmış Postbiyotiklerin Probiyotikler Üzerine Etkileri	50
4.2.2.1.	<i>Lactocaseibacillus casei</i> 431'ye Yönelik Probiyotik Geliştirici Aktivite	50
4.2.2.2.	<i>Bifidobacterium</i> 'a Yönelik Probiyotik Geliştirici Aktivite	54
4.2.3.	Ultrasese Maruz Kalmış Postbiyotiklerin Probiyotikler Üzerine Etkileri	59
4.2.3.1.	<i>Lactocaseibacillus casei</i> 431'ye Yönelik Probiyotik Geliştirici Aktivite	59
4.2.3.2.	<i>Bifidobacterium</i> 'a Yönelik Probiyotik Geliştirici Aktivite	62
4.3.	Postbiyotiklerde Kısa Zincirli Yağ Asidi	66
4.3.1.	Isıl İşleme Üretilmiş Postbiyotiklerin <i>L. casei</i> Ortamındaki KZYA Etkileri	66
4.3.2.	Isıl İşleme Üretilmiş Postbiyotiklerin <i>Bifidobacterium</i> Kültürü Ortamındaki KZYA Etkileri	71
4.3.3.	Ultrasesle Üretilmiş Postbiyotiklerin <i>L. casei</i> Ortamındaki KZYA Etkileri	76
4.3.4.	Ultrasesle Üretilmiş Postbiyotiklerin <i>Bifidobacterium</i> Kültürü Ortamındaki KZYA Etkileri	81
4.4.	Postbiyotiklerin Patojenler Üzerine Etkisi	86
4.4.1.	Isıl İşleme Maruz Kalmış Postbiyotiklerin Patojenler Üzerine Etkileri	86
4.4.2.	Ultrasese Maruz Kalmış Postbiyotiklerin Patojenler Üzerine Etkileri	92
4.5.	Sonuçların Toplu Değerlendirmesi	97

5. SONUÇLAR	100
KAYNAKÇA	102
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Postbiyotikler ve etki ettikleri bölgeler (Aguilar-Toala ve diğerleri, 2018)	8
Şekil 2.2 İnaktivasyon metotları ve etkileri (Barros, Pires, Guimarães, Abud, Almada, Pimentel, T. C., ve Cruz, 2021); İİ – Isıl İşlem, K – Kurutma, İR – İyonlaştırıcı Radyasyon, OI – Ohmik Isıtma, VUA – Vurgulu Elektrik Alan, UV – Ultra Viyole, S – Sonikasyon, YB – Yüksek Basınç, SCCO ₂ – Süperkritik Karbondioksit.....	10
Şekil 4.1 Isıl işlemle üretilen postbiyotiklerin analiz edilen özellikleri için TBA biplot grafiği (AA: antimikrobiyal aktivite; KZYA: kısa zincirli yağ asidi; PGA: probiyotik geliştirici aktivite).	98
Şekil 4.2 Ultrases işleme ile üretilen postbiyotiklerin analiz edilen özellikleri için TBP biplot grafiği (AA: antimikrobiyal aktivite; KZYA: kısa zincirli yağ asidi; PGA: probiyotik geliştirici aktivite).....	99

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1 Isıl İşlem ile İnaktivasyon Çalışma Planı	33
Tablo 3.2 Ultrases ile İnaktivasyon Çalışma Planı	34
Tablo 4.1 Belirli işlem sıcaklıklarında ve sürelerde su banyosunda bekletilen <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 mikroorganizmaların ve kontrollerinin ekimden 48 saat sonraki sayım sonuçları.*	39
Tablo 4.2 Farklı koşullarda uygulanan ultrases işleminin 10 mL’lik saf sudaki etkileri.*	41
Tablo 4.3 Farklı koşullarda uygulanan ultrases işleminin 10 mL’lik saf sudaki etkileri.*	41
Tablo 4.4 <i>Lactobacillus acidophilus</i> ’un farklı seyreltme düzeylerinde aktifleştirilmesi.	45
Tablo 4.5 Belirli genliklerde ve sürelerde ultrases işlemi gören <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 mikroorganizmalarının ve kontrollerinin ekimden 48 saat sonraki sayım sonuçları.*	46
Tablo 4.6 Farklı postbiyotik konsantrasyonlarının probiyotik gelişimini arttırıcı aktivitelere etkileri.*	49
Tablo 4.7 <i>Bifidobacterium</i> Kültürünün istenen düzeyde (10^5 - 10^6 kob/mL) gelişmesi için gerekli seyreltmelerin saptanması.*	50
Tablo 4.8 <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 kullanılarak ısıl işlemle üretilen postbiyotiklerin <i>Lactocaseibacillus casei</i> 431 üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizlerinin sayısal sonuçları.*	52
Tablo 4.9 <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 kullanılarak ısıl işlemle üretilen postbiyotiklerin <i>Bifidobacterium</i> kültürü üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizlerinin sayısal sonuçları.*	56
Tablo 4.10 <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 kullanılarak ultrases ile üretilen postbiyotiklerin <i>Lactocaseibacillus casei</i> 431 üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizlerinin sayısal sonuçları.*	60
Tablo 4.11 <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 kullanılarak ultrases ile üretilen postbiyotiklerin <i>Bifidobacterium</i> kültürü üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizlerinin sayısal sonuçları.*	63
Tablo 4.12 <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 kullanılarak ısıl işlemle üretilen postbiyotiklerin ilavesi ile <i>Lactocaseibacillus casei</i> 431 ortamında oluşan asetik, propiyonik ve izobütirik asitlerin değişimleri üzerindeki etkisi.*	69

Tablo 4.13 <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 kullanılarak ısıtıl işlemle üretilen postbiyotiklerin ilavesi ile <i>Lactocaseibacillus casei</i> 431 ortamında oluşan bütirik, izovalerik, valerik ve hegzanoik asitlerin değişimleri üzerindeki etkisi.*	70
Tablo 4.14 <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 kullanılarak ısıtıl işlemle üretilen postbiyotiklerin ilavesi ile <i>Bifidobacterium</i> kültürü ortamında oluşan asetik, propiyonik ve izobütirik asitlerin değişimleri üzerindeki etkisi.*	73
Tablo 4.15 <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 kullanılarak ısıtıl işlemle üretilen postbiyotiklerin ilavesi ile <i>Bifidobacterium</i> kültürü ortamında oluşan bütirik, izovalerik, valerik ve hegzanoik asitlerin değişimleri üzerindeki etkisi.*	75
Tablo 4.16 <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 kullanılarak ultrases işlemi ile üretilen postbiyotiklerin ilavesi ile <i>Lactocaseibacillus casei</i> 431 ortamında oluşan asetik, propiyonik ve izobütirik asitlerin değişimleri üzerindeki etkisi.*	78
Tablo 4.17 <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 kullanılarak ultrases işlemi ile üretilen postbiyotiklerin ilavesi ile <i>Lactocaseibacillus casei</i> 431 ortamında oluşan bütirik, izovalerik, valerik ve hegzanoik asitlerin değişimleri üzerindeki etkisi.*	79
Tablo 4.18 <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 kullanılarak ultrases işlemi ile üretilen postbiyotiklerin ilavesi ile <i>Bifidobacterium</i> kültürü ortamında oluşan asetik, propiyonik ve izobütirik asitlerin değişimleri üzerindeki etkisi.*	82
Tablo 4.19 <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 kullanılarak ultrases işlemi ile üretilen postbiyotiklerin ilavesi ile <i>Bifidobacterium</i> kültürü ortamında oluşan bütirik, izovalerik, valerik ve hegzanoik asitlerin değişimleri üzerindeki etkisi.*	84
Tablo 4.20 <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 kullanılarak kullanılarak ısıtıl işlemle üretilen postbiyotiklerin <i>Escherichia coli</i> 'ye karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivitenin sayısal sonuçları.*	88
Tablo 4.21 <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 kullanılarak kullanılarak ısıtıl işlemle üretilen postbiyotiklerin <i>Enterococcus faecalis</i> 'e karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivitenin sayısal sonuçları.*	90
Tablo 4.22 <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 kullanılarak kullanılarak ultrases ile üretilen postbiyotiklerin <i>Escherichia coli</i> 'e karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivitenin sayısal sonuçları.*	93
Tablo 4.23 <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 kullanılarak kullanılarak ultrases ile üretilen postbiyotiklerin <i>Enterococcus faecalis</i> 'e karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivitenin sayısal sonuçları.*	95

KISALTMALAR

KZYA	: Kısa Zincirli Yağ Asidi
GRAS	: Generally Recognized As Safe (Genel olarak güvenli sayılan)
LA	: <i>Lactobacillus acidophilus</i>
GC	: Gaz Kromatografi
HCl	: Hidroklorik Asit
ISAPP	: Uluslararası Bilimsel Probiyotikler ve Prebiyotikler Derneği



SEMBOLER

°C

: Celcius



1. GİRİŞ

Probiyotiklerin geçmişine bakıldığı zaman, bu terimin keşfinin ve bilgisinin, fermente gıdalarla ilgili olduğuna ve fermentasyona uğramış olan ilk gıdadan beri insanların hayatında olduğuna inanılmaktadır. ISAPP'a göre (Uluslararası Bilimsel Probiyotikler ve Prebiyotikler Derneği) fermente gıdalar, genellikle kontrollü mikrobiyal büyüme ve gıda bileşenlerinin enzimatik dönüşümleri olarak tanımlanmaktadır (Marco, Sanders, Gänzle, Arrieta, Cotter, Reid, Wolfe ve Hutkins, 2021). Bira, ekmek, şarap ve peynir gibi fermente gıdaların tüketimi uzun bir geçmişe sahiptir ve insan medeniyetlerinin gelişmesinden bu yana tüketildiği bilinmektedir (Gao, Li, Zhang, Sadiq, Simal-Gandara, Xiao ve Sang, 2021).

Probiyotik bakterilerin tüketimi, Mısır ve Orta Doğu medeniyetlerinin, gıdaların raf ömrünü uzatmak için fermentasyonu kullandığı eski zamanlardan beri meydana gelmektedir (Barros, Guimarães, Esmerino, Duarte, Silva, Silva ve Cruz, 2020). Bu mikroorganizmaların sağlık üzerine olumlu etkileri ilk defa 1907 yılında Elie Metchnikoff tarafından keşfedilmiştir. Probiyotik kavramı ilk defa 1953 yılında “Yaşamın sağlıklı gelişimi için gerekli aktif maddeleri” olarak ifade edilmiş ve yıllar geçtikçe probiyotikler için yeni tanımlar önerilmiştir. 2001 yılında FAO ve WHO uzmanlarından oluşan bir panelde “Yeterli miktarda alındığında konakçıya bir sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar” olarak düzenleme yapılmıştır (Cuevas-González, Liceaga ve Aguilar-Toalá, 2020). Son 20 yılda fonksiyonel gıdalarla ilgili araştırmalar önemli ölçüde ilerlemiştir. Prebiyotikler ve simbiyotikler gibi kelimeler bilinir hale gelmiştir (Barros ve diğerleri, 2020).

Fonksiyonel gıdalar hakkındaki bilgilerin gün geçtikçe artması, probiyotik mikroorganizma içeren gıdaların, yeni nesil sağlık ürünlerinin geliştirilmesinde rol almasına yol açmıştır (Aguilar-Toalá, Garcia-Varela, Garcia, Mata-Haro, González-Córdova, Vallejo-Cordoba ve Hernández-Mendoza, 2018). 2022 yılında yapılan bir çalışmada tüketicilerin probiyotik yoğurtları ve kefir ürünlerini diğer fonksiyonel gıdalardan daha çok tercih ettikleri ortaya koyulmuştur (Cebeci ve Mankan, 2022). Fonksiyonel gıda grubu olarak probiyotik tüketiminin diğer gruplara kıyasla %28,3 daha büyük bir paya sahip olduğu ve büyük bir hızla büyümeye devam edeceği bildirilmiştir.

Probiyotiklerin yeterli miktarda alındıklarında, tüketiciye sağlık yararları sağlayan canlı mikroorganizmalar oldukları bildirilmiştir (Gao ve diğerleri, 2021). Bu sağlık yararları, probiyotikler ile gastrointestinal ve immünolojik sistem arasındaki etkileşimler yardımıyla sağlanır. İnsan vücudunda bulunan gastrointestinal kanalda kolonize olan bakteri, virüs, maya gibi bazı mikroorganizmaların oluşturduğu ekosisteme bağırsak mikrobiyotası ya da diğer bir ismiyle bağırsak mikroflorası denilmektedir. Mikrobiyota kommensal, simbiyotik ve patojenik organizmaların tümünün oluşturduğu bir ekolojik komünitedir. Bu mikrobiyotanın gelişimini pek çok faktör etkileyebilmektedir. Bunlara; doğum şekli, annenin mikrobiyotası, anne sütü alımı, antibiyotik/probiyotik kullanımı ve beslenme şekli örnek olarak verilebilir (De Almada, Almada, Martinez ve Sant'Ana, 2016).

Probiyotik mikroorganizma içeren gıdalar, fonksiyonel gıdaların önemli bir kısmını oluşturmaktadır (Holzapfel, 2005). *Bifidobacterium* spp. ve *Lactobacillus* spp. gibi bakteriler ile *Saccharomyces* spp. gibi mayalar, probiyotik olarak kullanılan en yaygın mikroorganizmalardır. Bu sayılan mikroorganizmaların dışında daha yüzlerce probiyotik mikroorganizma olmasına rağmen bu mikroorganizmaların hepsinin mikrobiyolojik açıdan bazı ortak özellikleri bulunmaktadır. Bunlar şu şekilde sıralanabilir;

- Probiyotiklerin intestinal sistemde patojen mikroorganizmalara karşı bir bariyer oluşturmak suretiyle bu mikroorganizmaların epitel hücrelere yapışmasını engellediği düşünülmektedir (de Almada ve diğerleri, 2016).
- Probiyotik mikroorganizmalar, *E. coli* gibi diğer enteropatojenler için istenmeyen bir ortam oluşturup, bu grup mikroorganizmalara karşı antagonistik etki oluştururlar (Bermudez-Brito, Plaza-Díaz, Muñoz-Quezada, Gómez-Llorente, ve Gil, 2012).
- Probiyotik mikroorganizmaların çoğunluğu, başta laktik asit olmak üzere, asetik ve formik asit gibi organik asitler üreterek bağırsak pH'sını düşürürler. Böylece Gram negatif patojen bakterilerin üremesini engelleyen bir ortam oluştururlar.
- Probiyotik suşlar hidrojen peroksit, organik asit, bakteriosin gibi etken maddeler sayesinde antibakteriyel özellik gösterirler.
- Probiyotikler, patojen bakterilerin çoğalmak için gereksinim duydukları besinleri tüketirler ve bu bakterilerin üremelerini inhibe ederler.

- Probiyotik mikroorganizmalar lipaz, proteaz, amilaz, betaglukanaz gibi sindirime yardımcı olan enzimler salgılayarak ve B grubu vitaminler (niasin, biotin, pridoksin, pantotenik asit, folik asit, riboflavin, B12) sentezleyerek sindirime katkıda bulunurlar.
- Probiyotik bakterilerin safra tuzlarını serbest asitlere parçalamaları ve intestinal sistemden hızlı bir şekilde uzaklaştırmak suretiyle serum kolesterolünün düşürülmesinde etkili olduğu düşünülmektedir.
- Beslenmenin kanser oluşumunda önemli bir etken olduğu bilinmekte olup, probiyotik mikroorganizmaların beslenmede kullanımının kanser riskini azaltabildiği bildirilmiştir. Probiyotik mikroorganizmaların başta bağırsaklar olmak üzere diğer organlarda mutajenik etkileri engellemesi nedeniyle antikarsinojenik etkileri olduğu ortaya konulmuştur (de Almada ve diğerleri, 2016).

Ancak, bu özellikler ne kadar işe yarar da olsa, mikroorganizmaların canlı olmalarından kaynaklanan potansiyel riskler ve canlılıklarının korunabilmesi açısından probiyotiklerin istenilen etkide uygulaması gerçekleştirilememektedir.

Probiyotiklerin *Salmonella*'nın sebep olduğu lokal enfeksiyona benzer bir etki yaratabilir olduğu görülmüştür (Tsilingiri, Barbosa, Penna, Caprioli, Sonzogni, Viale ve Rescigno, 2012). Probiyotiklerle alakalı bazı teorik endişeler de bulunmaktadır. Şişkinlik, gaz, bakteriyemi, fungemi ve translokasyon, direnç geni bu teorik endişeler arasında sayılabilir (Aguilar-Toala ve diğerleri, 2018). Fungemi, kanda mantar tespit edilmesi ve bakteriyemi ise kanda bakteri tespit edilmesi olayıdır. Günlük alınması gereken dozun dışında alındığı zaman, mikrobiyotada bulunan bakterilerde, probiyotiklere karşı direnç gelişiminden sorumlu olan genler spontan ya da indüklenen mutasyonlarla veya direnç genlerinin başka bakterilerden transfer edilmesiyle kazanılmaktadır. Yani bakterilerin, probiyotiklerin etkilerini yok etmek için veya önlemek için bir veya birkaç geni mutasyona uğratarak ya da bu geni bir başka mikroptan edinerek yapabilirler. Sonrasındaysa bu direnç bedene yayılır (Aguilar-Toala ve diğerleri, 2018).

Canlı mikroorganizmaların, gıdaların işlenmesi ve depolanması sırasında neden olabilecekleri sıkıntılar göz önünde bulundurularak, probiyotiklerin belli metotlarla inaktive edilip gıdalarda kullanılabilmesi adına bazı çalışmalar yapılmıştır. Probiyotiklerin, insan sağlığı açısından pek çok yarar sağlayan canlı mikroorganizmalar olduğu ancak canlı olmalarından kaynaklanan

işleme, depolama ve maliyet gibi zorluklar nedeniyle kullanımlarının kolay olmadığı görülmüştür (de Almada ve diğerleri, 2016). Bu yüzden de paraprobiyotik ve postbiyotik gibi, probiyotiklerin belli inaktivasyon metotları yardımıyla inaktive edilmesiyle oluşmuş terimler ortaya çıkmıştır. Paraprobiyotik ve postbiyotikler canlı mikroorganizmalar olmadıkları için probiyotiklerde rastlanan zorluklarla karşılaşmayacağı ve daha verimli olarak kullanılabileceği düşünülmekte ve bu konu hakkında çalışmalar devam etmektedir.

Bu tez çalışmasında ise ısıl işlem ve ultrases yöntemi ile *Lactobacillus acidophilus*'tan postbiyotik elde edilerek, seçilmiş olan inaktivasyon yöntemlerinin etkinlikleri kontrol edilmiştir. Elde edilen postbiyotiklerin, bağırsak mikrobiyotasında da doğal olarak bulunan *Lactocaseibacillus casei* ve *Bifidobacterium* kültürü üzerinde geliştirici bir aktiviteyi sağlayıp sağlamadığı analiz edilmiştir. Aynı zamanda *Lactobacillus acidophilus*'tan elde edilmiş olan postbiyotiklerin, *Lactocaseibacillus casei* ve *Bifidobacterium* kültürü ortamındaki kısa zincirli yağ asidi üretimindeki etkinleri incelenmiştir. Patojenler üzerinde ise inhibe edici bir özelliğe sahip olup olmadıkları analiz edilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Terminolojiler

Probiyotiklerin canlı mikroorganizmalar olmasından kaynaklanan işleme ve depolama sırasında oluşabilecek sorunlar ve olası sağlık zararları göz önünde bulundurulmuştur. Bu nedenle, son yapılan çalışmalarda canlı olmayan mikroorganizmaların veya bakteriyel metabolizmaların yan ürünleri yani metabolitlerinin de konakta biyolojik aktivite gösterebileceği bildirilmiştir. Bu nedenle paraprobiyotik ve postbiyotik gibi yeni terminolojiler ortaya çıkarılmıştır (Tsilingiri ve Rescigno, 2013).

Canlı olmayan bakteri hücrelerin, mikrobiyal parçalarının veya hücre kalıntılarının yeterli dozlarda uygulandığında, fazladan biyoaktiviteye sahip sağlık yararları sağlayabilecekleri belirtilmiştir (Tsilingiri ve Rescigno, 2013).

Paraprobiyotiklere ‘inaktif probiyotikler’ ya da ‘hayalet probiyotikler’ de denilmektedir. Paraprobiyotikler, probiyotiklerin belirli inaktivasyon yöntemleriyle inaktive edildiği ve canlı mikroorganizmanın gerektirdiği zorluklara takılmadan, tüketiciye sağlık yararı sağlayabilen cansız mikroorganizmalardır (Aguilar-Toala ve diğerleri, 2018).

Probiyotikler, yapısal ve metabolik değişikliklere neden olan inaktivasyon yöntemlerine tabi tutulduktan sonra ‘postbiyotikler, metabolitler, probiyotik hücre parçaları ve biyojenikler’ hücre yırtılmasından sonra salınırlar. Çözünür faktörler ya da metabolik yan ürünler; kısa zincirli yağ asitleri, enzimler, peptitler, endo ve ekzopolisakkaritler, hücre yüzeyi proteinleri vitaminler ve organik asitlerdir (Aguilar-Toala ve diğerleri, 2018).

Postbiyotikler ve paraprobiyotikler için yapılan tanım ‘Yeterli miktarda uygulandığında sağlığı ve refahı destekleyen cansız hücreler de dahil olmak üzere gıda ve mikrobiyal bileşenlerden salınan mikroorganizmalar tarafından üretilen bileşikler’ şeklindedir. Burada cansız hücreler olarak bahsedilenler paraprobiyotiklerdir. Salınan mikroorganizmalar tarafından üretilen bileşikler ise postbiyotiklerdir. Bu yapılan tanımlamalar için tartışmalar hala devam etmektedir. Bir grup araştırmacı, paraprobiyotikler ve postbiyotikler için yapılan bu tanımlamaların bozulmadan bu şekilde kalması gerektiğini savunsa da başka bir grup ise

probiyotiklerin inaktivasyonu sonucu ortaya çıkan bütün lizatların ve metabolitlerin tümüne postbiyotik denmesi gerektiğini savunmaktadır.

2.1.1. Paraprobiyotik

Paraprobiyotikler, DNA filamentlerinin kırılması, hücre zarının bozulması veya hücre zarında mekanik hasar gibi mikrobiyal hücre yapılarını değiştiren faktörlere maruz kaldıktan sonra canlılıklarını tamamen kaybeden mikroorganizmalardır (de Almada ve diğerleri, 2016).

Paraprobiyotiklerin immünomodülatör aktivitesi, fiziksel yöntemlerle (ısı, gama radyasyonu, ultraviyole radyasyonu, yüksek hidrostatik basınç, ultrasonikasyon) veya kimyasal (asit deaktivasyonu) gibi yöntemlerle elde edilebilir. Birçok yöntem olmasına rağmen, en uygun yöntemin seçimi, kullanılacak olan mikroorganizmaya ve istenilen klinik faydaya bağlı olarak değişebilmektedir. Bu nedenle de mikroorganizmanın inaktivasyonu süresince probiyotiklerin sağladığı sağlık yararlarının da korunabileceği bir yöntem seçilmesi paraprobiyotikler için en önemli hususlardan biridir (de Almada ve diğerleri, 2016). Ayrıca, probiyotik mikroorganizmalar, biyolojik etkileri ve etki mekanizmaları açısından suşuna özgü olduğu için birbirlerine benzer değillerdir. Yani, aynı cins ya da türün farklı suşlarının benzer olmayan fonksiyonel ve fenotipik özellikler gösterdiği söylenebilmektedir (Gao ve diğerleri, 2021).

Paraprobiyotiklerin kanıtlanmış olan bazı sağlık yararları şu şekildedir;

- Alkole bağlı karaciğer hastalıkları
- Solunum ve enfeksiyon hastalıkları
- İshal
- Kolitin tedavisinde ve önlenmesinde etkinlik
- Atopik dermatit
- Diş çürükleri
- Alerjiler
- Patojenlerin inhibisyonu
- Bağışıklık sistemi ve bağırsak mikrobiyotasının modülasyonu
- Anksiyete ve stresin iyileştirilmesi (de Almada ve diğerleri, 2016)

Paraprobiyotiklerin gıdalarda uygulanmasının, probiyotiklere kıyasla avantajları ise şu şekildedir;

- Paraprobiyotiklerin, gıdada bulunan diğer bileşenler ile daha az etkileşim kurması ya da hiç kurmaması doğrudan uzatılmış raf ömrüne yansımaya neden olur.
- İşleme açısından düşüncecek olursak, cansız olduklarından dolayı termal işlemlerden önce eklenebilirler ve bu da daha geniş bir işleme yeteneği anlamına gelir.
- Daha uzun raf ömürlerine sahip oldukları için daha fazla kolaylık dağılayabilecek depolama şartları ve taşıma kolaylığı sağlar. (de Almada ve diğerleri, 2016)

2.1.2. Postbiyotikler

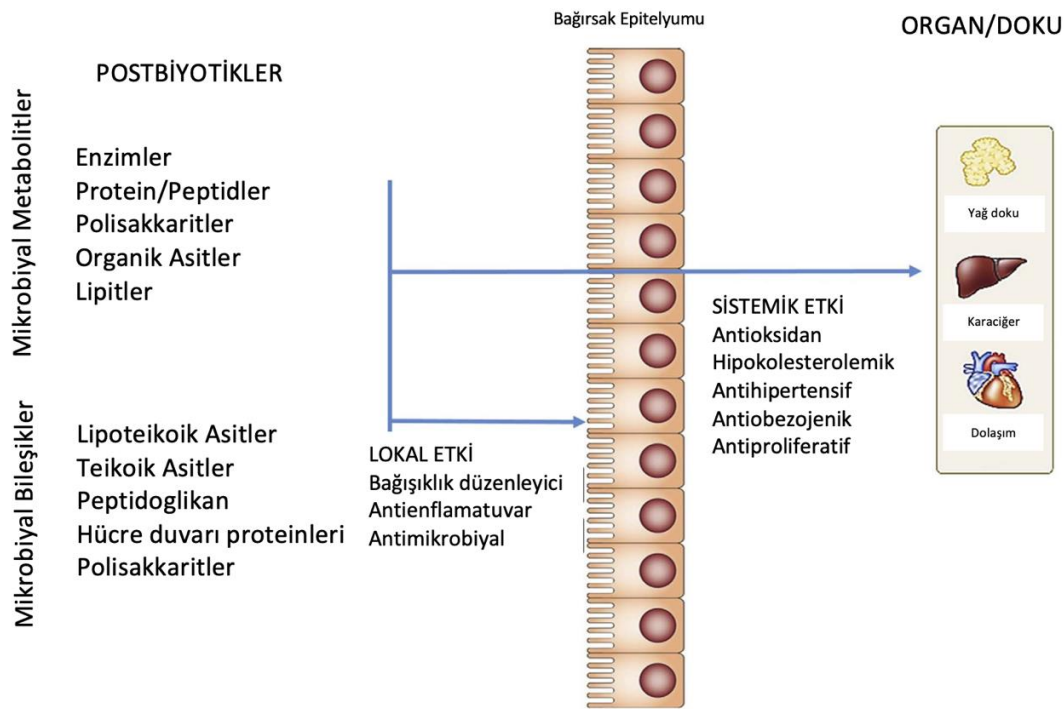
Postbiyotikler genel olarak birçok fermente gıdada doğal olarak bulunabilir. Bazı bakteri ve mantar türlerinin suşlarından da ekstrakte edilebilirler (özellikle *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşları, ama aynı zamanda *Streptococcus*, *Akkermansia muciniphila*, *Eubacterium hallii*, *faecalibacterium* ve *Saccharomyces boulardii*). Canlı hücrelerden salınan metabolitler de, belli inaktivasyon yöntemleri ile inaktive edilen mikroorganizmalar da postbiyotiktir. Isı, enzimle muamele, ultrases ve çözücü muameleleri gibi hücre parçalanmasını sağlayan üretim yöntemleri mevcuttur. Bu işlemlerden sonra santrifüjleme, diyaliz, liyofilizasyon ve kolon saflaştırması ile gerçekleştirilebilen ekstraksiyon ve temizleme adımlarının uygulanması gerekir (Barros ve diğerleri, 2020).

Postbiyotik tüketiminde gözlemlenebilir bazı faydalara; antiinflamatuvar, antioksidan, antihipertansif, antiproliferatif, antimikrobiyal, hipokolesterolemik ve immünomodülatör aktiviteler örnek verilebilir. Postbiyotikler gözlemlenebilen bu fizyolojik faydalara göre ya da hem bakteriyel hücre bileşiklerinden hem de mikrobiyalardan elde edilen bileşimlerine göre farklı kategorilerde sınıflandırılabilirler. Bu nedenle, fermente gıdaların tüketilmesi yoluyla elde edilen sağlığa yararlı birçok etki, sadece sindirilen canlı mikroorganizmalarla değil, aynı zamanda fermentasyon sırasında üretilen mikrobiyal yapılar ve metabolitlerle de ilişkili olduğundan, postbiyotiklerle de ilişkilidir. Mesela, sütün fermentasyonu sırasında, laktik asit bakterileri laktik asit ve sağlığın geliştirilmesi ile ilgili olan süt proteini hidrolizinden türetilen birçok metabolit ve ikincil peptit üretir (Barros ve diğerleri, 2020).

Postbiyotik ve Paraprobiyotiklerin tüketiciye ulaştırılabilmesi için kullanılabilecek en iyi araç gıdalardır. Ancak paraprobiyotik ve postbiyotiklerin üretiminde önem gösterilmesi gereken bazı hususlar vardır;

- Probiyotik tür ve suşların belirlenmesi bu konuda dikkat edilmesi ve önem gösterilmesi gereken en önemli konulardan biridir.
- Bir diğeri ise doğru inaktivasyon yönteminin bulunması ve doğru şartlar altında uygulanmasıdır.
- Sonuncu olarak ise Postbiyotik ve Paraprobiyotiklerin raf ömrü boyunca gıdalarda sahip oldukları stabilite ve aktiviteleri olduğu söylenebilir (de Almada ve diğerleri, 2016).

Postbiyotikler, mikrobiyal metabolitler ve mikrobiyal bileşiklerdir. Probiyotiklerin inaktivasyonu ile elde edilmiş olan metabolitler dokulara etki eder. Bileşiklerin ise lokal etkileri vardır ve bağırsak epitelyumuna etki ederler (Aguilar-Toala ve diğerleri, 2018).



Şekil 2.1 Postbiyotikler ve etki ettikleri bölgeler (Aguilar-Toala ve diğerleri, 2018)

2.1.3. Psikoparaprobiyotikler

Psikobiyotikler yeterli miktarlarda alındıklarında bağırsak mikrobiyotası ile etkileşime girerek zihinsel sağlık yararları sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanır. Ruh sağlığının geliştirilmesinde katkı sağlayabilecek paraprobiyotikler için ise psikoparaprobiyotik adı verilmiştir ve antidepresan etkileri vardır (Barros ve diğerleri, 2020).

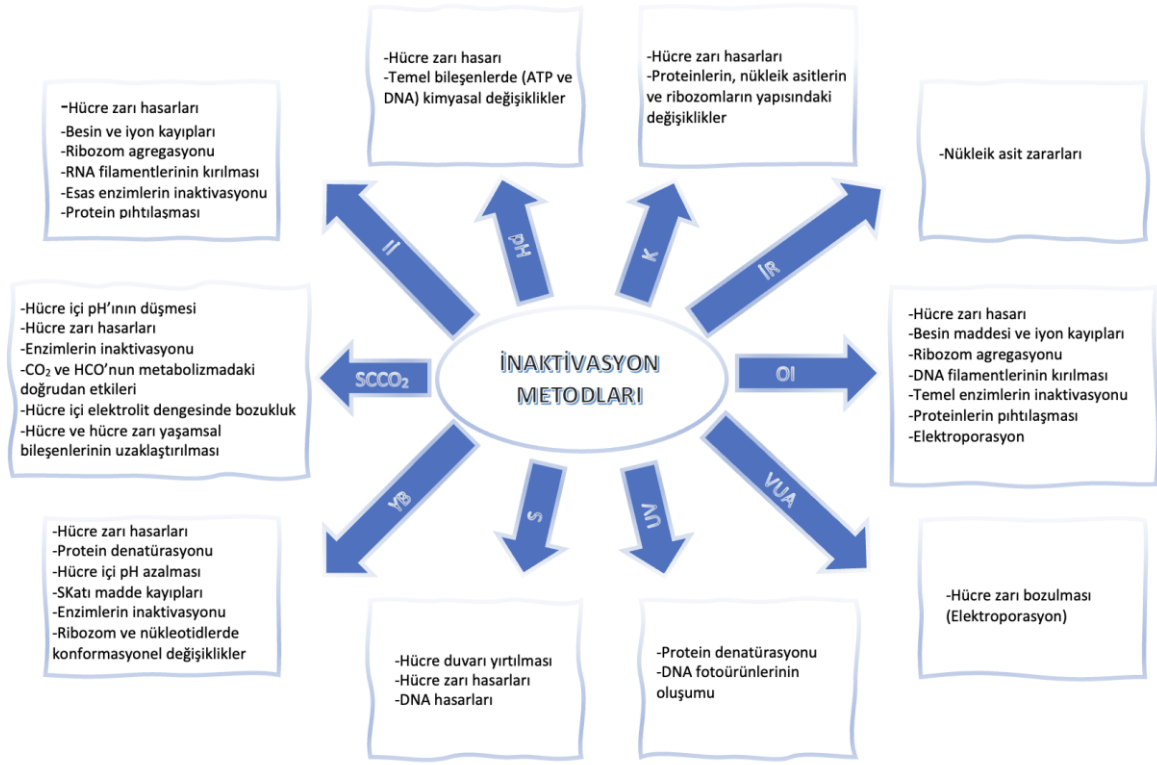
2.1.4. Prebiyotikler ve Simbiyoz

Sağlık yararı sağlayan konakçı mikroorganizmalar tarafından seçici olarak kullanılan substratlara prebiyotik denir. Simbiyotik ise konakçıyı olumlu yönde etkileyen, bağırsakta probiyotiklerin hayatta kalmasını ve kolonizasyonunu iyileştiren probiyotikler ve prebiyotiklerin kombinasyonudur. Simbiyozun diğer bir ismi de ortakyaşımdır. İki canlının tek bir organizma gibi birbirleriyle yardımlaşarak yaşamalarına simbiyotik yaşam denir. Probiyotikler ve prebiyotikler de simbiyozlara en güzel örnektir (Gao ve diğerleri, 2021).

2.2. İnaktivasyon Yöntemleri

Doğru inaktivasyon yönteminin, postbiyotik elde edilecek suş ve elde edilmesi istenen yarar doğrultusunda belirlenmesi büyük önem arz etmektedir (Şekil 2.2).

Bu çalışmada *Lactobacillus acidophilus* mikroorganizması, ultrases ve ısıtma işlem yöntemleri ile inaktive edilecektir.



Şekil 2.2 İnaktivasyon metotları ve etkileri (Barros, Pires, Guimarães, Abud, Almada, Pimentel, T. C., ve Cruz, 2021); İI – Isıl İşlem, K – Kurutma,İR – İyonlaştırıcı Radyasyon, Oİ – Ohmik Isıtma, VUA – Vurgulu Elektrik Alan, UV – Ultra Viyole, S – Sonikasyon, YB – Yüksek Basınç, SCCO₂ – Süperkritik Karbondioksit.

2.2.1. Isıl İşlem Yöntemi ile İnaktivasyon

Isıl işlemler, belirli bir süre ısı uygulamasından oluşan mikroorganizmaları inaktive etmek için en yaygın prosedürleri içerir. Bunlar arasında, özel öneme sahip pastörizasyon ve sterilizasyon vardır. Pastörizasyon, normalde 100 °C'nin altındaki sıcaklıklar kullanılarak nispeten hafif ısıl işlemlerin kullanılması anlamına gelir. Sterilizasyon, daha kısa süreler için pastörizasyondan daha şiddetli bir ısıl işlem (>100 °C) kullanan bir işlemdir (Lado ve Yousef, 2002; Piyasena, Mohareb ve Mckellar, 2003).

Isıl işlemler, mikroorganizmaların D ve z değerleri olmak üzere iki parametre ile tanımlanan ısıl direncine göre belirlenir. D değeri, belirli bir sıcaklıkta mikrobiyal popülasyonun %90'ını (1 log döngü) azaltmak için gereken süredir. z değeri, D değerinde on kat azalmayla sonuçlanan sıcaklık aralığını temsil eder (Awuah, Ramaswamy ve Economides, 2007).

Hedefler vejetatif hücreler veya sporlarsa, mikroorganizmaların türü, sıcaklık, büyüme ortamı, büyüme aşaması, strese önceden maruz kalma, pH değeri, su aktivitesi ve ısıtma modu gibi birçok faktörden etkilenir. (Juneja ve Sofos, 2002).

Genel olarak, ısı ile inaktivasyon mekanizması, zarların hasar görmesi, besin ve iyon kaybı, ribozom agregasyonu, DNA filamentlerinin yırtılması, esansiyel enzim inaktivasyonu ve protein pıhtılaşmasını içerir. Böylece neredeyse tüm hücre yapısı yüksek sıcaklıklardan etkilenir (Gould, 1989). Paraprobiyotiklerde, ısı işlemlerin bağışıklık düzenleyici özelliklerini etkileyen hücre kabalığını ve pürüzlülüğünü arttırdığı rapor edilmiştir (Ou, Ko, ve Lin, 2020). Uygulanan sıcaklık ne kadar yüksek olursa, canlı hücrelerle karşılaştırıldığında hücre yüzeyinin pürüzlülüğü ve pürüzlülük derecesi o kadar yüksek olur. Ou ve diğerleri (2020), de Man, Rogosa ve Sharpe (MRS) et suyunda yetiştirilen probiyotik laktik asit bakterilerinin (LAB) bağışıklık düzenleyici özellikleri, dört sıcaklık/zaman iki terimlisine (60 C 30 dakika, 80 20 dakika için C, 5 dakika için 95 C ve 5 dakika için 100 C) suşa bağlı olarak gösterildi. Bununla birlikte, hücre kabalığı ve pürüzlülüğündeki artış ile paraprobiyotiklerin sağladığı faydalı sağlık etkilerinin azalması arasında bir ilişki gözlemlenmiştir (Ou ve diğerleri, 2020). Ek olarak, inaktivasyon koşullarının, daha yüksek sıcaklıklarda azalan suşların yapışma kapasitesini de etkilediği görülmektedir (Ou ve diğerleri, 2020). Adezyon, probiyotiklerin konaklar üzerinde faydalı etkilerini gerçekleştirmeleri, bağışıklık sistemini modüle etmeleri ve patojenlere karşı antagonistik etki göstermeleri için önemli bir özelliktir (Bermudez-Brito ve diğerleri, 2012). Bu bulgular, paraprobiyotikler için üretim süreçlerinin geliştirilmesi için en önemli şeydir, çünkü her probiyotik suşun, pozitif konakçı sağlığını etkileme yeteneklerini korurken, inaktivasyon için farklı sıcaklık/zaman ikili terimleri talep edebileceğini gösterirler. Ayrıca, paraprobiyotiklerin sağlık yararlarında azalmaya neden olan faktörlerin mekanizmalarının ve kontrolünün anlaşılması, farklı uygulamalarda etkinliklerini sağlamak için gerekli olacaktır. Paraprobiyotiklerin etkinliğini korurken probiyotiklerin etkisizleştirilmesini sağlamak için optimizasyon araçlarının kullanılması (Granato ve Calado, 2013), bu zorlukların bir kısmının üstesinden gelinmesine yardımcı olabilir. Bu yönlerin araştırılmasının önemine dair mükemmel bir örnek, Kawase ve diğerleri tarafından elde edilen bulgularla gösterilebilir (Kawase, He, Miyazawa, Kubota, Yoda ve Hiramatsu, 2011). Bu araştırmacılar, ısı işlemin paraprobiyotiklerin koruyucu etkilerini iyileştirebileceğini veya olumsuz yönde etkileyebileceğini öne sürdüler. Aslında, bu yazarlar, 70°C'de inaktive edilmiş

mikroorganizma ile tedavi edilen hayvanlara kıyasla, grip virüsü ile enfekte olmuş ve 90°C'de 5 dakika boyunca inaktive edilmiş *L. gasseri* ile tedavi edilen farelerin akciğerlerinde vücut ağırlığında ve viral yükte daha yüksek bir azalma olduğunu bildirmiştir. 30 dakika süreyle C, her ikisi de fizyolojik tuzlu su (NaCl) solüsyonunda süspanse edildi. *L. gasseri* hücrelerinin 70 C'de 30 dakika süreyle maruz kalmasının, bağışıklık düzenleyici özellikler gösterebilen bileşenler için daha kısa sürelerle (örn. 5 dakika). Bu, inaktivasyon koşulları ve sağlık yararları mekanizmaları hakkındaki bilgilerin paraprobiyotiklerin üretimi için süreçlerin geliştirilmesi için ne kadar önemli olduğunu vurgulamaktadır. Buna rağmen günümüzde paraprobiyotik üretmeyi hedefleyen probiyotiklerin ısı inaktivasyon koşulları için literatürde büyük bir çeşitlilik bulunmaktadır. Zaman/sıcaklık iki terimleri, kullanılan probiyotik suşuna ve beklenen faydaya bağlı olarak seçilen belirli bir koşulla, 60-121 C'de 5 ila 60 dakika arasında değişir (Kawase ve diğerleri, 2011; Ou ve diğerleri, 2011).

2.2.2. Ultrases Yöntemi ile İnaktivasyon

Sonikasyon, moleküller arası etkileşimleri kırmak için ultrases kullanımını içeren fiziksel bir yöntemdir. Ultrases, insan işitme eşiğinin (>16 kHz) üzerindeki frekanslara sahip ses dalgaları olarak tanımlanır (Gibson, Hai, Yong, Farnood, ve Seto, 2008). Bu teknik, sıvı ortamda, kabarcıklar patladığında sıcaklık ve basınçta bir artış üreten gaz kabarcıkları oluşturur. Bu işlem için ultrases dalgalarının doğası, maruz kalma süresi, hedef mikroorganizmalar ve sıcaklık gibi bazı faktörler dikkate alınmalıdır (Butz ve Tauscher, 2002).

Sonikasyon teknolojisi, hücre içi kavitasyon nedeniyle biyolojik yapılarda fiziksel ve kimyasal değişikliklere neden olur. Kavitasyon, yapısal ve fonksiyonel unsurları hücresel lizis noktasına kadar bozan mikro-mekanik şoklarla sonuçlanır. Mikrobiyal inaktivasyon, esas olarak hücre duvarı yırtılması, hücre zarlarının bozulması ve incilmesi ve serbest radikallerin üretimi yoluyla DNA hasarından kaynaklanır (Birmpa, Sfika ve Vantarakis, 2013; Ross, Griffiths, Mittal ve Deeth, 2003).

Literatürde sonikasyon yoluyla probiyotik mikroorganizmaların inaktivasyonuna ve sağlık yararlarının daha fazla değerlendirilmesine odaklanan çok az makale vardır. Shin ve diğerleri (2010), sonikasyonla inaktive edilmiş *Bifidobacterium longum*'un (10^8 - 10^9 CFU/mL'de fizyolojik salin solüsyonunda süspanse edilmiş) sıçanlarda yüksek kolesterol seviyelerini

azalttığını göstermiştir. Bununla birlikte, bu çalışmada kullanılan inaktivasyon koşulunun (5 dakika sonikasyon), maksimum sağlık yararları sağlamak için en uygun strateji olup olmadığı bilinmemektedir. Ayrıca diğer koşullar veya inaktivasyon yöntemleri ile karşılaştırma yapılmamıştır (Shin, Park, Lee, Kim, An, Kim, Ha ve 2010).

Hücre içi içeriklerinin veya hücre duvarı bileşenlerinin antioksidan, antiinflamatuvar ve immünomodülatör özellikler göstermesi nedeniyle *Lactocaseibacillus casei* CRL 431 ve *Bacillus coagulans* GBI-30 suşları seçilmiştir. Ultrasonikasyon yöntemi ile inaktive edilen suşların hücre içi içeriği ve hücre duvarı bileşenlerinin insan vücudu sistemini modüle etme konusunda büyük bir potansiyele sahip olduğu görülmüştür. İn vitro ortamda yapılan deney sonucunda immünostimülan, antiinflamatuvar, nöroprotektif, antiproliferatif, immünomodülatör ve antineoplastik etkiler gözlemlenmiştir (Cuevas-González ve diğerleri, 2020).

34 laktik asit suşunun (*Bifidobacterium* cinsinin 7 suşu, *Lactobacillus* cinsinin 11 suşu, *Lactococcus* cinsinin 6 suşu ve *Streptococcus thermophilus* türünün 10 suşu) antioksidan özellikleri askorbik ve linolenik asit oksidasyonuna, troloks eşdeğeri antioksidan kapasiteye, hücre içi glutatyona ve süperoksit dismutaza etkileri in vitro ortamda test edilmiştir. İnaktivasyon yöntemi olarak sonikasyon uygulanmıştır. Yapılan çalışmada bütün suşların hem hücre içi hem de hücre dışı bileşiklerinin antioksidan etki yaratması sonucunda antioksidan etkinin laktik asit suşlarında genelde görülen bir durum olabileceği düşünülmüştür. Özellikle *Lactocaseibacillus casei*, *L. acidophilus* ve *Bifidobacterium lactis* ile desteklenmiş sıçanlarda oksidatif stres sonrasında GSH (glutasyon) konsantrasyonunun geri kazanılmasında benzer bir etkinlik görülmüştür. Bu çalışma, seçilen probiyotik suşların, konakçıda hücresel antioksidan savunmaların arttırılmasının temelini oluşturabileceği hipotezini desteklemektedir (Amaretti, Nunzio, Pompei, Raimondi, Rossi, ve Bordoni, 2013).

Limosilactobacillus reuteri suşunun fare modellerinde ve insan deneklerinde kullanılmasıyla birlikte, yaraları onarma kapasitesindeki artış test edilmiştir. *L. reuteri* suşunun yara iyileştirmeleri için yeterli olduğuna ve farelerde hipotalamusun paraventriküler çekirdeğinin kaudal kısmındaki oksitosin pozitif hücrelerin sayısını artırdığına dair bir sonuç elde edilmiştir. Mikrop kaynaklı olan oksitosin, yara onarımı da dahil olmak üzere önemli yararlı konak etkilerinin indüklenmesi için gereklidir. Sonikasyon ile hazırlanan steril *L. reuteri*

lizatı, farelerde oksitosinin artması ve sağlık yararlarını elde etmek için yeterli olduğu ve bu fenomenlerin canlı probiyotik bakterilerden ziyade bakteriyel bir bileşen tarafından tetiklendiği düşünülmüştür (Varian ve diğerleri, 2017).

Son çalışmalar, peroksizom proliferatörle aktive olan reseptör (PPAR) aktivasyonunun, dislipidemi dahil olmak üzere metabolik bozuklukları iyileştirdiğini ortaya koymuştur. Etkili bir PPAR agonisti belirlemek için, laktik asit bakterileri dahil olmak üzere beş cins ve 32 türe ait gıda odaklı bakteri suşlarından organik solvent özlerinin in vitro PPAR α/γ aktivasyon kabiliyeti taratılmış ve *Lactobacillus amylovorus* CP1563 (CP1563) en yüksek PPAR α/γ agonist aktivitesi performansı göstermiştir. Ayrıca, türün fiziksel parçalanmasının, in vitro CP1563 aktivitesinin ifadesi için organik çözücü ekstraksiyonunun yerine geçebileceği bulunmuştur. Fonksiyonel gıda üretimi için sonikasyon yöntemi ile parçalanmış CP1563 seçilmiş ve ardından hayvan deneyleri yapılmıştır. Obez bir fare modelinde, 12 hafta süreyle parçalanmış CP1563 ile tedavinin plazmadaki LDL-kolesterol ve trigliserit düzeylerini düşürdüğü, ateroskleroz indeksini önemli ölçüde azalttığı ve plazma HDL-kolesterol düzeyini artırdığı bulunmuştur. Bu nedenle, parçalanmış CP1563'ün dislipideminin önlenmesi ve tedavisi için bir aday olabileceği sonucuna varılmıştır (Nakamura, Ishida, Aihara, Sawada ve Ashida, 2016).

2.3. Probiyotikler ve Kültür Ortamları

2.3.1. *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus, Gram-pozitif, fakültatif anaerobik bir bakteri olup, insan gastrointestinal sisteminin doğal florasında önemli bir yere sahiptir. Bu bakteri, probiyotik özellikleri sayesinde insan sağlığına çeşitli faydalar sağlar ve bu özellikleri pek çok bilimsel çalışma ile desteklenmiştir. *L. acidophilus*, sindirim sistemi sağlığını destekleyerek bağırsak florasının dengelenmesine katkı sağlar. Bu probiyotik, laktaz enzimi üreterek laktoz intoleransı olan bireylerde laktozun sindirimine yardımcı olur ve sindirim sorunlarını azaltır. Probiyotiklerin bağırsak sağlığı üzerindeki olumlu etkilerini kapsamlı bir şekilde inceleyerek *L. acidophilus*'un sindirim sistemi fonksiyonlarını iyileştirdiğini belirtmiştir (Sanders, Merenstein, Reid, Gibson ve Rastall, 2019). *L. acidophilus*, bağışıklık sistemini güçlendirebilir. Bu probiyotik bağışıklık hücreleri ile etkileşime girerek sitokin üretimini artırır ve enfeksiyonlara karşı koruma sağlar. Düzenli tüketimi, bağışıklık sistemi

fonksiyonlarını destekleyerek soğuk algınlığı ve grip gibi enfeksiyonlara karşı direnci artırabilir (Gill ve Prasad, 2008).

L. acidophilus, bacteriocin adı verilen antimikrobiyal peptitler üreterek zararlı bakterilere karşı doğal bir savunma mekanizması oluşturur. *L. acidophilus*'un bu antimikrobiyal maddeleri üreterek patojenik mikroorganizmaların büyümesini engellediğini ve gıda güvenliğine katkıda bulunduğunu göstermiştir. Bu özellik, *L. acidophilus*'un *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* gibi yaygın patojenlere karşı etkin olduğunu gösterir (Gänzle, 2015).

L. acidophilus, kısa zincirli yağ asitleri (KZYA) üreterek bağırsak sağlığını destekler. KZYA'ların bağırsak hücreleri için önemli bir enerji kaynağı olduğunu ve inflamasyonu azaltarak bağırsak sağlığını desteklediğini belirtmiştir. Bu asitler, kolonositler için enerji kaynağı olarak bağırsak sağlığını olumlu yönde etkiler (Besten, Van Eunen, Groen, Venema, Reijngoud, ve Bakker, 2013).

Lactobacillus acidophilus, probiyotik özellikleri sayesinde insan sağlığına birçok fayda sağlayan önemli bir bakteridir. Sindirim sistemi sağlığını desteklemek, bağışıklık fonksiyonlarını güçlendirmek, antimikrobiyal aktivite göstermek gibi çeşitli faydaları bulunmaktadır. Klinik çalışmalar tarafından desteklenen bu probiyotik, sağlıklı bir yaşam tarzının bir parçası olarak güvenle kullanılabilir. Bu bilgiler dahilinde analiz edilmesi gereken probiyotik seçimi için en uygun suşun *Lactobacillus acidophilus* olması gerektiğine karar verilmiştir.

2.3.2. *Lacticaseibacillus casei*

Lacticaseibacillus casei, Gram-pozitif, fakültatif anaerobik bir bakteri olup, insan gastrointestinal sisteminin doğal florasında önemli bir yer tutar. Bu bakterinin probiyotik özellikleri, birçok bilimsel çalışma ile desteklenen çeşitli sağlık faydaları sağlar. *L. casei*, sindirim sistemini destekleyerek bağırsak florasının dengesine yardımcı olur. Probiyotiklerin sindirim sistemi üzerindeki etkileri kapsamlı bir şekilde incelenmiş olup, *L. casei*'nin bağırsak fonksiyonlarını iyileştirdiği ve sindirim problemlerini azalttığı gösterilmiştir (Sanders ve diğerleri, 2019). Ayrıca, bu probiyotiğin irritabl bağırsak sendromu (IBS) ve diğer gastrointestinal rahatsızlıkların semptomlarını hafiflettiği belirlenmiştir.

L. casei bağışıklık sistemini güçlendirebilir. Gill ve Prasad'ın (2008) belirttiği üzere, bu probiyotik bağışıklık hücreleri ile etkileşime girerek sitokin üretimini artırır ve enfeksiyonlara karşı koruma sağlar. *L. casei*'nin düzenli tüketimi, bağışıklık sistemi fonksiyonlarını destekleyerek soğuk algınlığı ve grip gibi enfeksiyonlara karşı direnci artırabilir. Bu bakteri, zararlı bakterilere karşı doğal bir savunma mekanizması olarak antimikrobiyal maddeler üretir. Gänzle'nin (2015) çalışması, *L. casei*'nin bu antimikrobiyal maddeleri üreterek patojenik mikroorganizmaların büyümesini engellediğini ve gıda güvenliğine katkıda bulunduğunu göstermiştir. Bu özellik, *L. casei*'nin *Escherichia coli* ve *Salmonella* gibi yaygın patojenlere karşı etkili olduğunu göstermektedir.

L. casei, laktoz intoleransı olan bireylerde laktozun sindirimine yardımcı olarak laktaz enzimi üretir. Bu probiyotik, laktozun daha iyi sindirilmesini sağlayarak laktoz intoleransı semptomlarını azaltır (Sanders ve diğerleri, 2019). Bu özellik, laktoz intoleransı olan bireyler için *L. casei* içeren probiyotik ürünlerin yararlı olabileceğini gösterir. Ayrıca, *L. casei*, kısa zincirli yağ asitleri (KZYA) üreterek bağırsak sağlığını destekler. Besten ve diğerlerinin (2013) çalışması, KZYA'ların bağırsak hücreleri için önemli bir enerji kaynağı olduğunu ve inflamasyonu azaltarak bağırsak sağlığını desteklediğini belirtmiştir. Bu asitler, kolonositler için enerji kaynağı olarak bağırsak sağlığını olumlu yönde etkiler.

McFarland'ın (2015) çalışması, *L. casei*'nin klinik çalışmalarla desteklenen sağlık faydalarını kapsamlı bir şekilde ele alır. Bu çalışma, probiyotiklerin antibiyotik kullanımı sonrası bağırsak florasını yenilemek ve antibiyotiğe bağlı ishal riskini azaltmak için kullanımının klinik kanıtlarını tartışır. *L. casei*'nin, antibiyotik ilişkili ishalin önlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir. Marteau ve Shanahan'ın (2003) belirttiği üzere, *L. casei* genellikle güvenli kabul edilen (Generally Recognized As Safe - GRAS) bir probiyotiktir ve çeşitli gıda ürünlerinde yaygın olarak bulunur.

2.3.3. *Bifidobacterium longum*

Bifidobacterium longum, Gram-pozitif, anaerobik bir bakteri olup, insan gastrointestinal sisteminin doğal florasında yaygın olarak bulunur. Bu bakteri, özellikle bebeklerin bağırsak florasında önemli bir yer tutar ve probiyotik özellikleri sayesinde insan sağlığına çeşitli faydalar sağlar. *B. longum*, sindirim sistemi sağlığını desteklemek, bağışıklık sistemini

güçlendirmek, antimikrobiyal aktivite göstermek ve mental sağlığı iyileştirmek gibi çeşitli faydalar sunar.

B. longum, sindirim sistemi sağlığını destekleyerek bağırsak florasının dengelenmesine yardımcı olur. Bu probiyotik, sindirim enzimlerinin aktivitesini artırarak besinlerin daha iyi sindirilmesine ve emilmesine katkı sağlar. Ayrıca, *B. longum*, bağırsak hareketlerini düzenleyerek kabızlık ve ishal gibi sindirim problemlerinin önlenmesine yardımcı olur. Probiyotiklerin bağırsak sağlığı üzerindeki olumlu etkilerini kapsamlı bir şekilde inceleyerek *B. longum*'un sindirim sistemi fonksiyonlarını iyileştirdiği belirtilmiştir (Sanders ve diğerleri, 2010).

B. longum, bağışıklık sistemini güçlendirebilir. Bu probiyotik, bağırsak duvarını güçlendirerek patojenlerin vücuda girişini engeller ve bağışıklık hücrelerini aktive ederek enfeksiyonlara karşı koruma sağlar. *B. longum*'un bağışıklık sistemi fonksiyonlarını desteklediğini ve enfeksiyonlara karşı direnci artırdığını göstermiştir. Düzenli tüketimi, bağışıklık sistemi fonksiyonlarını destekleyerek soğuk algınlığı ve grip gibi enfeksiyonlara karşı direnci artırabilir (Gill ve Prasad, 2008).

B. longum, zararlı bakterilere karşı doğal bir savunma mekanizması olarak antimikrobiyal maddeler üretir. *B. longum*'un bu antimikrobiyal maddeleri üreterek patojenik mikroorganizmaların büyümesini engellediğini ve gıda güvenliğine katkıda bulunduğunu göstermiştir. Bu özellik, *B. longum*'un *Escherichia coli* ve *Clostridium difficile* gibi yaygın patojenlere karşı etkin olduğunu gösterir (Gänzle, 2015).

B. longum, mental sağlığı iyileştirebilir. Yapılan çalışmalar, bağırsak-beyin eksenini olarak bilinen bir mekanizma ile bağırsak mikrobiyotasının mental sağlık üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. *B. longum*, serotonin gibi nörotransmitterlerin üretimini artırarak stres ve anksiyete gibi mental sağlık sorunlarının hafifletilmesine katkı sağlayabilir. *B. longum*'un anksiyete ve depresyon belirtilerini azalttığını ve genel mental sağlığı iyileştirdiğini göstermiştir (Allen, Hutch, Borre, Kennedy, Temko, Boylan ve Clarke, 2016).

Bifidobacterium longum, probiyotik özellikleri sayesinde insan sağlığına birçok fayda sağlayan önemli bir bakteridir. Sindirim sistemi sağlığını desteklemek, bağışıklık fonksiyonlarını güçlendirmek, antimikrobiyal aktivite göstermek ve mental sağlığı iyileştirmek gibi çeşitli faydaları bulunmaktadır.

2.4. Patojenler ve Postbiyotiklerin Antimikrobiyal Etkileri

2.4.1. *Escherichia coli*

E. coli'nin çeşitli suşları vardır ve bu suşlar, genetik varyasyonlarına bağlı olarak farklı özellikler gösterir. Çoğu *E. coli* suşu zararsızdır ve sindirim sisteminin normal bir parçasıdır, ancak bazıları bağırsak enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları (İYE), yenidoğan menenjit ve daha ciddi kan dolaşımı enfeksiyonlarına neden olabilir (Kaper, Nataro ve Mobley, 2004). *E. coli*'nin en bilinen patojenik suşlarından biri, enterohemorajik *E. coli* (EHEC) olarak bilinen O157'dir. Bu suş, şiddetli karın ağrısı, kanlı ishal ve hemolitik üremik sendrom (HUS) gibi ciddi komplikasyonlara yol açabilir (Nataro ve Kaper, 1998).

EHEC ve diğer patojenik *E. coli* suşları, genellikle kontamine yiyecek ve su yoluyla bulaşır. Özellikle az pişmiş et ürünleri, pastörize edilmemiş süt ve meyve suları, kontamine sebzeler ve hijyenik olmayan su kaynakları başlıca bulaşma yollarıdır (Rangel, Sparling, Crowe, Griffin ve Swerdlow, 2005). Bu tür enfeksiyonların önlenmesi için uygun gıda işleme ve hijyen kurallarına uyulması önemlidir.

E. coli'nin neden olduğu hastalıkların tedavisinde, genellikle semptomatik tedavi uygulanır. Dehidrasyonun önlenmesi ve sıvı-elektrolit dengesinin sağlanması, özellikle gastroenterit vakalarında önemlidir. Antibiyotikler, özellikle İYE ve sistemik enfeksiyonlar gibi ciddi durumlarda kullanılabilir. Ancak, antibiyotik direnci, *E. coli* tedavisinde büyük bir zorluk oluşturur. Son yıllarda, karbapenem direnci gibi çoklu ilaç direnci gösteren suşların ortaya çıkması, tedavi seçeneklerini daha da kısıtlamıştır (Pitout, 2012).

E. coli ile ilgili araştırmalar, mikrobiyolojinin çeşitli alanlarında önemli ilerlemelere yol açmıştır. *E. coli*, genetik mühendisliği ve biyoteknoloji çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir model organizmadır. DNA replikasyonu, transkripsiyon, translasyon ve gen regülasyonu gibi temel biyolojik süreçlerin anlaşılmasında önemli katkılar sağlamıştır (Blattner, Plunkett, Bloch, Perna, Burland, Riley ve Shao, 1997).

E. coli gibi patojenik bakterilere karşı çeşitli mekanizmalar aracılığıyla etki ederler. Bu mekanizmalar, rekabetçi dışlama, antimikrobiyal maddelerin üretimi, bağışıklık sisteminin modülasyonu ve bağırsak bariyer fonksiyonunun güçlendirilmesini içerir.

Probiyotiklerin *E. coli*'ye karşı en temel etkilerinden biri rekabetçi dışlama yoluyla gerçekleşir. Probiyotik bakteriler, bağırsak epiteline yapışarak patojenlerin bağlanmasını engeller ve böylece onların kolonizasyonunu azaltır (Collado ve Sanz, 2006). Bu mekanizma, özellikle *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerinin etkin olduğu bilinmektedir (Lee ve Salminen, 1995).

Antimikrobiyal maddelerin üretimi de probiyotiklerin önemli bir savunma mekanizmasıdır. Probiyotik bakteriler, laktik asit, asetik asit ve bakteriyosinler gibi maddeler salgırlar. Bu maddeler, *E. coli* gibi patojenlerin büyümesini ve çoğalmasını inhibe eder (Servin, 2004). Örneğin, *Lactobacillus rhamnosus* GG'nin ürettiği laktik asidin, bağırsak pH'sını düşürerek *E. coli* O157'nin büyümesini engellediği gösterilmiştir (Bernet, Brassart, Neeser, ve Servin, 1994).

Probiyotikler ayrıca bağışıklık sistemini modüle ederek *E. coli* enfeksiyonlarına karşı koruma sağlarlar. Probiyotik bakteriler, bağırsak mukozasında immunoglobulin A (IgA) üretimini artırarak patojenlere karşı immün yanıtı güçlendirir (Gill ve Guarner, 2004). Bu da, *E. coli* gibi patojenlerin bağırsak duvarına zarar vermesini önlemeye yardımcı olur.

Bağırsak bariyer fonksiyonunun güçlendirilmesi, probiyotiklerin bir diğer önemli etkisidir. Probiyotikler, bağırsak epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantıları (tight junctions) güçlendirerek bağırsak geçirgenliğini azaltır ve böylece patojenlerin ve toksinlerin sistemik dolaşıma geçişini engeller (Karczewski, Troost, Konings, Dekker, Kleerebezem, Brummer ve Wells, 2010).

2.4.2. *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis, Gram-pozitif, fakültatif anaerobik bir bakteri olup, insan gastrointestinal sisteminin doğal florasında yaygın olarak bulunan bir mikroorganizmadır. *E. faecalis*, çevresel koşullara karşı son derece dayanıklıdır ve geniş bir sıcaklık, pH ve tuz konsantrasyonu aralığında hayatta kalabilir (Fisher ve Phillips, 2009). Bu özellikleri nedeniyle, hastane enfeksiyonları dahil olmak üzere çeşitli klinik durumlarda patojen olarak önemli bir rol oynar.

E. faecalis, sağlık ve hastalık durumlarında çeşitli rollere sahiptir. Normal bağırsak florasının bir parçası olarak, sağlıklı bireylerde genellikle zararsızdır ve bağırsak sağlığının korunmasına yardımcı olur. Ancak, bağışıklık sistemi zayıflamış bireylerde veya antibiyotik kullanımı sonrasında bağırsak florasının dengesinin bozulduğu durumlarda fırsatçı patojen haline gelebilir (Gilmore, Clewell, Ike, ve Shankar, 2014). *E. faecalis*, idrar yolu enfeksiyonları, endokardit, yara enfeksiyonları ve bakteriyemi gibi ciddi enfeksiyonlara yol açabilir (Arias ve Murray, 2012).

E. faecalis'in antibiyotik direnci, özellikle hastane ortamlarında büyük bir endişe kaynağıdır. Bu bakterinin çeşitli antibiyotiklere karşı direnç geliştirme kapasitesi, tedavi edici seçenekleri sınırlayabilir ve enfeksiyon kontrolünü zorlaştırabilir. Vancomycin-Dirençli Enterokoklar (VRE), özellikle *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerinde önemli bir sorun olup, enfeksiyonların tedavisini daha da karmaşık hale getirmiştir (Hidron, Edwards, Patel, Horan, Sievert, Pollock ve Fridkin, 2008). *E. faecalis*'in antibiyotik direnci ve genetik değişim yeteneği, halk sağlığı açısından ciddi bir tehdit oluşturmaktadır.

E. faecalis'in genomik özellikleri de dikkat çekicidir. Bu bakteri, yatay gen transferi yoluyla çeşitli direnç ve virölans genlerini kazanabilir. Genomik analizler, *E. faecalis*'in çevresel adaptasyon ve patojenite ile ilgili birçok gen içerdiğini ortaya koymuştur (Paulsen, Banerjei, Myers, Nelson, Seshadri, Read ve Fraser, 2003). Bu genler, bakteri hücre duvarının yapı taşlarını, toksin üretimini ve immün sistemden kaçışı kolaylaştıran çeşitli mekanizmaları kodlar.

Probiyotikler, bağırsak mikrobiyotasının dengesini düzenleyerek ve patojenlerin büyümesini inhibe ederek *Enterococcus faecalis* gibi zararlı bakterilere karşı etkili olabilirler. Probiyotiklerin *E. faecalis*'e karşı etkileri birkaç mekanizma ile açıklanabilir. Birincisi, probiyotikler, bağırsak epitel hücrelerine yapışarak ve kolonize olarak patojenik bakterilerin yerleşmesini engelleyebilirler (Oelschlaeger, 2010). Bu mekanizma, rekabetçi engelleme olarak bilinir ve probiyotiklerin bağlanma bölgelerini doldurarak patojenlerin tutunma ve çoğalma yeteneklerini azaltır.

İkincisi, probiyotikler antimikrobiyal maddeler üretebilirler. Bu maddeler arasında organik asitler, hidrojen peroksit ve bakteriyosinler bulunur. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleri gibi probiyotikler, düşük pH oluşturarak ve bakteriyosinler üreterek *E. faecalis*'in büyümesini

doğrudan inhibe edebilirler (Corr, Li, Riedel, O'Toole, Hill ve Gahan, 2007). Özellikle bakteriyosinler, patojen bakterilerin hücre zarını bozarak onların ölmesine neden olabilir.

Üçüncüsü, probiyotikler bağışıklık sistemi üzerinde modülatör etkilere sahip olabilirler. Probiyotikler, bağışıklık hücrelerini aktive ederek ve inflamatuvar yanıtları düzenleyerek *E. faecalis* gibi patojenlerle savaşan konak savunma mekanizmalarını güçlendirebilirler (Ng, Hart, Kamm, Stagg ve Knight, 2009). Bu immünomodülatör etki, probiyotiklerin sitokin üretimini artırarak ve makrofaj, doğal öldürücü hücreler gibi immün hücrelerin etkinliğini artırarak sağlanabilir.

Son olarak, probiyotikler, bağırsak bariyer fonksiyonunu iyileştirerek patojenlerin bağırsak mukozasından geçişini engelleyebilirler. Probiyotikler, sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunu artırarak ve bağırsak epitelyal bütünlüğünü koruyarak patojenlerin translokasyonunu azaltabilirler (Otte ve Podolsky, 2004).

Bu mekanizmalar, probiyotiklerin *E. faecalis* gibi patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisinde potansiyel faydalarını göstermektedir. Ancak, spesifik probiyotik suşların etkinliğini ve bu mekanizmaların ayrıntılarını belirlemek için daha fazla klinik araştırmaya ihtiyaç vardır.

2.5. Yapılan Çalışmalar

2.5.1. Paraprobiyotik ve Postbiyotik ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Almada ve diğerlerinin (2021) yaptıkları çalışmada gama ışınlaması yöntemi ile *Bifidobacterium animalis* inaktive edilmiş, durum makarnasına eklenmiş ve bunun sonucunda bu makarnayı tüketen sıçanların bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Etkileri daha iyi anlayabilmek adına sıçanlar üç gruba ayırmışlardır. Birinci gruptaki sıçanlar standart diyet, ikinci gruptakiler makarna içeren diyet, üçüncü gruptakiler ise ışınlama yöntemi ile inaktive edilmiş *Bifidobacterium animalis* eklenmiş makarna ile beslenmiştir (Almada, Almada-Érix, Costa ve Graça, 2021).

Paraprobiyotik elde etmek için ışınlamanın kullanılması, bir miktar bütünlük veya metabolik aktiviteye sahip inaktive hücrelerin elde edilmesine bir alternatif olarak önerilmiştir. Paraprobiyotik makarna ile beslenen, standart diyet alan ve makarna ile beslenen sıçan

grupları arasında gıda alımını veya vücut ağırlığını etkileyen önemli bir değişikliğin olmadığı gözlemlenmiş ancak 15 günün sonunda bu üç grup arasında, paraprobiyotik makarna ile beslenen sıçanların (Standart diyet alanlara kıyasla) glikoz ve toplam kolesterol seviyelerinde önemli düzeyde bir azalmanın olduğu gözlemlenmiştir. Trigliserit, HDL, AST ve ALT düzeylerinde de %95 anlam düzeyinde bir farklılık gözlemlenmemiştir (Almada ve diğerleri, 2021).

Standart diyet ile beslenen sıçanlar ile paraprobiyotik içeren makarna ile beslenen sıçanlar arasında önem düzeyinde bir fark olmasına rağmen paraprobiyotik makarna ve makarna ile beslenen sıçanlar arasında bir fark olmaması, düşen glikoz seviyesinin makarnanın bileşiminden de kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. Elde edilen sonuçlara göre paraprobiyotik makarnaya dahil edilme oranı *B. animalis*'in kolesterol düşürme yeteneğini etkilememiştir (Almada ve diğerleri, 2021).

Paraprobiyotiklerin kolesterolü düşürmesi için önerilen bazı mekanizmalar mevcut;

- Ölü hücrelerden hücresel bileşenlerin salgılanması.
- Ölü hücre metabolik ürünleri tarafından kolesterol sentezinde yer alan enzimlerin inhibisyonu.
- Hücre bileşenleri-bağlanma yoluyla kolesterolün vücuda geri dönüşümünün önlenmesi.
- Ölü hücrelerden salınan metabolik ürünlerin safra tuzlarının geri dönüşümü ve eliminasyonu ile etkileşimi.

Bağırsak mikrobiyota analizleri, paraprobiyotik makarna tüketiminin, makarna ve kontrol gruplarına kıyasla *Firmicutes*'i artırdığını ve *Bacteroidetes*'i azalttığını göstermiştir. *Firmicutes*'ün artışı, bazı *Firmicutes* türleri uzun zincirli polisakkaritleri parçalayabildiğinden ve konakçıdaki glikozun bağırsak emilimini artırabildiğinden, sindirilemeyen liflerden enerji çıkarma yeteneğinin gelişmesiyle ilişkilendirilmiştir (Almada ve diğerleri, 2021).

Makarna ile beslenen grupta standart diyet ile beslenen gruba kıyasla, *firmicutes* oranında bir artış olmaması paraprobiyotik içeren makarna ile beslenen gruptakilerdeki *firmicutes* artışı, bu gözlemlenen değişikliklerin makarnaya dahil edilen paraprobiyotik tarafından indüklenmiş olduğu düşünülmüş (Almada ve diğerleri, 2021).

Probiyotikler, bağırsak florasını dengeleyerek insanların ve hayvanların üzerinde olumlu sağlık etkileri sağlayan canlı mikroorganizmalardır. Probiyotik içeren birçok fonksiyonel gıda vardır ama bu gıdalar arasında en önemli olarak kabul gören fonksiyonel gıdalar süt ürünleridir. Yoğurt, duysal özellikleri, temel besin maddeleri ve iyi uyumluluk sağlamaları nedeniyle probiyotiklerin uygulanmaları için uygun bir ortamdır. Ayrıca yoğurtta bulunan probiyotiklerin antioksidan, antihipertansif, antimikrobiyal, hipolipidemik ve immün modülatör aktiviteye sahip biyoaktif bileşikler oluşturabileceği belirtilmiştir. İşleme koşulları pıhtı özelliklerine etki eder. Bu araştırmada probiyotik organizmaların ölü hallerinin yoğurdun reolojik özellikleri üzerindeki etkisi araştırılmış. Öldürülen probiyotik hücrelerin, yoğurdun dokusunu güçlendirmiş olduğu görülmüş (Parvarei, Fazeli, Mortazavian, Nezhad, ve Mortazavi, 2020).

İltihaplanma olarak bilinen inflamasyon, herkeste meydana gelen ve bağışıklık sisteminin vücudu çeşitli hastalık veya yaralanmalara karşı korumak amacıyla oluşturduğu bir tepkidir. Kronik inflamasyon ise bağışıklık tepkisinin bozulmasına, düşük üretime ve hayvancılıkta düşük performansın yanı sıra çiftçiler için ciddi ekonomik kayıplara neden olabileceği düşünülmüştür. *Lactiplantibacillus plantarum* tarafından üretilen postbiyotiklerin, son zamanlarda doğal bir antioksidan kaynağı olduğu, büyüme performansını, iltihaplanmayı önleyici ve bağışıklık tepkilerini desteklediği bildirilmiştir. Fermantasyon ortamının *L. plantarum* postbiyotik bileşimleri üzerindeki etkileri daha önce araştırılmamış ve bu yüzden de formüle edilmiş besiyeri ve ticari MRS kullanılarak aktifleştirilen altı *L. plantarum* suşu tarafından üretilen postbiyotiklerin uçucu bileşiklerini, organik asit bileşimini ve antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerini karşılaştırmak için karşılaştırmalı bir çalışma yapılmıştır (Chang, Foo, Loh, Lim ve Mutalib, 2021b).

Çeşitli *L. plantarum* suşları tarafından üretilen postbiyotikte asetik asit, kaproik asit ve laktik asit olmak üzere üç organik asit tespit edilmiştir. Asetik asit konsantrasyonu fermantasyon ortamından etkilenirken, kaproik asit postbiyotik RG11'de en yüksek olarak tespit edilmiştir. Laktik asit, tüm postbiyotiklerde saptanan baskın bileşiktir ve MRS ortamı kullanılarak üretildiğinde postbiyotik RS5'te önemli ölçüde en yüksek konsantrasyona sahip olduğu görülmüştür (Chang ve diğerleri, 2021b).

Enflamasyon, vücutta patojenler, alerjenler, radyasyon, toksin ve oksidatif stresin neden olduğu stresörlerin dengesizliği olduğunda ortaya çıkan temel bir doğal savunma sürecidir. Moleküler reaksiyonları ve hücresel aktiviteyi içeren bir dizi koruyucu mekanizma olan inflamasyon, kalıcı hasarı önlemek için doku onarımını hızlandırır. Enflamatuvar süreç ayrıca *Salmonella* sp. gibi kaçınılmaz mikrobiyal zorluklara karşı bağışıklık oluşturmaya da yardımcı olur. Enflamasyon, enfeksiyonla savaşmak için temel bir süreç olmasına rağmen, uzun süreli ve kronik enflamasyon, doku ve organ hasarı ve ölüm gibi zararlı sonuçlara yol açar. Hayvancılıkta, üretimin yoğunlaştırılması, düşük kalite ve yem maddelerinde kontaminasyon ile genetik seleksiyon dahil olmak üzere çok sayıda faktör inflamasyonun ortaya çıkmasına neden olur. Sonuç olarak bu, düşük besin Emilimi, iştahsızlık, bozulmuş bağırsak mimarisi ve sızdıran bağırsak nedeniyle zayıf büyüme performansına ve üretime katkıda bulunacaktır, bu da bunun yerine bağışıklık sisteminde büyük miktarda enerji tüketimine yol açacaktır. Sonuç olarak, iltihaplanma çiftçilerin ekonomik canlılığını ve gıda ürün kalitesini azaltır ve hayvan sağlığını tehlikeye sokar. Bu fenomenle karşılaşmak için probiyotik bakteriler tarafından sentezlenen doğal biyoaktif bileşenler, inflamasyonun potansiyel düzenleyicileri olarak hizmet eder (Chang ve diğerleri, 2021b).

Postbiyotikler, hücre içermeyen süpernatant preparasyonlarına kıyasla enfeksiyon, antitümör, immünomodülatör ve antiaterosklerotik etkileri önlemek ve yara iyileşmesini iyileştirmek için konakçıya veya gıdaya sağlık yararları sağlar. Yemde *L. plantarum* postbiyotiklerinin takviyesi, çiftlik hayvanlarının büyüme performansını, yumurtlama performansını villus yüksekliğini, kandaki antioksidan aktiviteyi ve bağışıklık tepkisini iyileştirir ve ısı stresi nedeniyle piliçlerin fizyolojik aktiviteleri üzerindeki olumsuz etkileri azaltır (Chang ve diğerleri, 2021b).

Ayrıca, *L. plantarum* postbiyotikleri, fermentasyon ortamına inülin dahil edildiğinde *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* ve VRE gibi çeşitli patojenik bakterilere karşı daha yüksek inhibitör aktivite sergilemiştir. Bu nedenle, bu mevcut araştırmanın amacı, farklı formüle edilmiş ortamlar kullanılarak altı *L. plantarum* suşu tarafından üretilen postbiyotiklerin kompozisyonunu ve fonksiyonel özelliklerini karşılaştırmaktır (Chang ve diğerleri, 2021b).

Sonuç olarak, bu çalışmada formüle edilmiş besiyerinin altı *L. plantarum* suşu tarafından üretilen postbiyotiklerin kompozisyonları ve fonksiyonel özellikleri üzerindeki etkisi aydınlatılmıştır. Postbiyotiklerin bileşimi ve fonksiyonel özellikleri suşa bağımlıydı, bu sayede postbiyotik RG11, RI11 ve RS5, daha yüksek konsantrasyonda asetik asit, kaproik asit ve laktik asit içeren daha yüksek inhibitör ve antioksidan aktiviteler sergiledi. Mevcut çalışma ayrıca, fermentasyon ortamının, yüksek antioksidan, antibakteriyel, antienflamatuar, antimikrobiyal ve antikanser özellikleri. Formüle edilmiş bir ortam kullanılarak üretilen *L. plantarum* suşlarının postbiyotikleri, hayvancılık endüstrisi için doğal bir biyoaktif büyüme destekleyicisi olarak uygulanmak üzere umut verici bir potansiyel garanti eder (Chang, Foo, Loh, Lim ve Mutalib, 2021b).

2.5.2. *Lactobacillus* Suşları ile Yapılan Çalışmalar

Lactobacillus suşlarından üretilen paraprobiyotikler ve postbiyotikler, probiyotiklerin sağladığı sağlık faydalarını destekleyen ve tamamlayan yeni nesil biyoaktif maddeler olarak tanımlanabilir. Paraprobiyotikler, canlı olmayan veya inaktive edilmiş probiyotik mikroorganizmalar iken, postbiyotikler, probiyotik mikroorganizmaların metabolik ürünleri veya hücre bileşenleridir. Her iki biyomolekül türü de sağlığı iyileştirici etkiler gösterebilir ve çeşitli hastalıkların tedavi ve önlenmesinde önemli roller oynayabilir.

Paraprobiyotikler, canlı mikroorganizmaların taşıdığı potansiyel riskleri taşımadan probiyotiklerin sağladığı faydaları sunabilir. Canlı probiyotikler, bağışıklık sistemi zayıf bireylerde enfeksiyon riski oluşturabilirken, paraprobiyotikler bu riski minimize eder (Taverniti ve Guglielmetti, 2011). *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus rhamnosus* gibi suşlardan elde edilen paraprobiyotikler, anti-inflamatuar ve immünmodülatör etkiler göstererek bağırsak sağlığını iyileştirebilir. Örneğin, inaktive edilmiş *Lactobacillus acidophilus* hücreleri, bağırsak epitel hücrelerinin bariyer fonksiyonunu güçlendirebilir ve patojenlerin geçişini engelleyebilir (Segers ve Lebeer, 2014).

Postbiyotikler ise probiyotiklerin fermentasyon sürecinde ürettiği biyoaktif molekülleri içerir. Bu moleküller arasında kısa zincirli yağ asitleri (KZYA'lar), peptidler, polisakkaritler ve hücre duvarı bileşenleri bulunur. KZYA'lar, özellikle bütirat, bağırsak sağlığını destekleyen önemli postbiyotiklerdendir. Bütirat, bağırsak epitel hücrelerinin enerji kaynağı olarak işlev görür ve anti-inflamatuar özellikler gösterir (Rivière, Selak, Lantin, Leroy ve De Vuyst,

2016). *Lactobacillus* suşlarından elde edilen postbiyotikler, bağırsak mikrobiyotasının dengelenmesine, patojenlerin inhibisyonuna ve bağışıklık sisteminin modülasyonuna katkıda bulunur (Tsilingiri ve Rescigno, 2013).

Lactobacillus rhamnosus GG tarafından üretilen peptidler, immün yanıtları modüle ederek inflamasyonu azaltabilir ve bağırsak mukozasının iyileşmesini destekleyebilir. Ayrıca, postbiyotikler, antimikrobiyal aktivite göstererek patojenlerin büyümesini ve kolonizasyonunu inhibe edebilir. Örneğin, *Lactiplantibacillus plantarum* tarafından üretilen bakteriyosinler, çeşitli Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı etkili olabilir (Gänzle, 2015).

Lactobacillus suşları ile yapılan çeşitli çalışmalar, paraprobiyotik ve postbiyotiklerin sağlık üzerindeki olumlu etkilerini göstermiştir (Taverniti ve diğerleri, 2012; Gänzle ve diğerleri, 2015; Vinderola ve diğerleri, 2011; Tsilingiri ve Rescigno, 2013). Bu çalışmalar, *Lactobacillus* suşlarından elde edilen paraprobiyotik ve postbiyotiklerin bağırsak sağlığı, bağışıklık sistemi modülasyonu ve patojenlerle mücadele konularında önemli faydalar sunduğunu ortaya koymaktadır.

Bir örnek olarak, Taverniti ve diğerleri (2012), inaktive edilmiş *Lactobacillus rhamnosus* GG hücrelerinin anti-inflamatuar etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada, paraprobiyotiklerin canlı probiyotikler kadar etkili olduğu ve bağırsak epitel hücrelerinde iltihaplanmayı azalttığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar, paraprobiyotiklerin inflamatuvar bağırsak hastalıkları gibi kronik inflamatuvar durumların tedavisinde kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Bir başka önemli çalışma, *Lactiplantibacillus plantarum* suşlarından elde edilen postbiyotiklerin antimikrobiyal etkilerini incelemiştir. Gänzle ve diğerleri (2015), *Lactiplantibacillus plantarum* tarafından üretilen bakteriyosinlerin, çeşitli patojenik bakterilere karşı güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, bakteriyosinlerin özellikle *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus* gibi gıda kaynaklı patojenlere karşı etkili olduğu bulunmuştur. Bu bulgular, postbiyotiklerin gıda güvenliği ve korunmasında potansiyel bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Lactobacillus acidophilus suşlarıyla yapılan bir başka çalışma, bu suşların postbiyotiklerinin bağırsak mikrobiyotasının bileşimini nasıl etkilediğini araştırmıştır. Vinderola ve diğerleri

(2011), *Lactobacillus acidophilus*'un fermantasyon ürünlerinin, bağırsak mikrobiyotasındaki faydalı bakterilerin oranını artırdığını ve zararlı bakterilerin büyümesini inhibe ettiğini bulmuşlardır. Bu çalışma, postbiyotiklerin prebiyotik etkiler göstererek bağırsak sağlığını destekleyebileceğini ortaya koymaktadır (Vinderola, Binetti, Burns, ve Reinheimer, 2011b).

Bunun yanı sıra, *Limosilactobacillus reuteri* suşları ile yapılan araştırmalar, bu suşların postbiyotiklerinin bağışıklık sistemi üzerinde olumlu etkileri olduğunu göstermiştir. Tsilingiri ve Rescigno (2013), *Limosilactobacillus reuteri* tarafından üretilen metabolik ürünlerin, makrofaj ve dendritik hücreler gibi bağışıklık hücrelerinin aktivitesini artırdığını ve anti-inflamatuar sitokinlerin salınımını teşvik ettiğini rapor etmişlerdir. Bu sonuçlar, postbiyotiklerin bağışıklık sistemini modüle ederek enfeksiyonlara karşı korunmada önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak, *Lactobacillus* suşlarından elde edilen paraprobiyotik ve postbiyotiklerle yapılan çalışmalar, bu biyoaktif bileşiklerin sağlık üzerindeki potansiyel faydalarını açıkça ortaya koymaktadır. Paraprobiyotikler ve postbiyotikler, bağırsak sağlığını iyileştirme, bağışıklık sistemi modülasyonu ve patojenlerle mücadele konularında önemli etkiler gösterebilirler. Bu bulgular, gelecekte probiyotiklerin tamamlayıcı veya alternatif tedavi seçenekleri olarak daha yaygın kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Almada ve diğerleri (2021) 6 farklı yöntemle (ısı, ultrases, yüksek pH, düşük pH, ışınlama, süperkritik CO₂) inaktive ettiği probiyotik bakterilerin (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactocaseibacillus casei* subsp. *paracasei* ve *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* 12) ölü hücrelerinin Wistar ratlarının intestinal mikrobiyotası ve biyokimyasal parametreleri üzerine etkisini araştırmıştır. Günlük paraprobiyotik alımının kontrole kıyasla gıda alımını, vücut ağırlığını, glukoz ve trigliserit seviyelerini, antioksidan enzimlerin ekspresyonunu veya termal şok proteinlerini etkilemediği saptanmıştır ($p>0,05$). Işınlama ve süperkritik CO₂ ile inaktive edilen *Bifidobacterium lactis*, serumdaki toplam kolesterol düzeylerini düşürmüştür ($p<0,05$). Süperkritik CO₂ ile inaktive edilen *Bifidobacterium lactis*, albümin ve kreatinin düzeylerini artırırken, HDL-kolesterol düzeylerini düşürmüştür ($p<0,05$). Clostridia (%45,6-56), Bacteroidal (%31,9-44,2) ve Laktobasiller (%3,9-7,8) paraprobiyotik gruplardaki ana florayı oluşturmuştur. Bu çalışma sonucunda paraprobiyotiklerin özelliklerinin, inaktivasyon yöntemine, kullanılan yöntemin yoğunluğuna ve kullanılan suşa bağlı olduğu bildirilmiştir.

Parvarei ve diğeri (2020) *Lactobacillus acidophilus* ATCC SD 5221 ve *Bifidobacterium lactis* BB-12 bakterilerini suya ilave etmiş ve karışımı ısı ile inaktive ederek (otoklavda 121° C’de 15 dakika) yogurt üretiminde kullanmıştır. İnaktive bakterileri içeren yogurt paraprobiyotik yogurt olarak adlandırılmış ve paraprobiyotik yogurdun fizikokimyasal ve teknolojik özelliklerini probiyotik yogurtla kıyaslanmıştır. Paraprobiyotik ilavesi starter kültürlerin canlılığını arttırmış ve probiyotik yogurt örneklerine kıyasla daha düşük sinerez ve daha yüksek su tutma kapasitesi ile sonuçlanmıştır. Bu çalışmada genel olarak paraprobiyotiklerin yogurda dahil edilmesinin daha az teknolojik zorluk içerdiği ve fonksiyonel yogurt geliştirilmesinde probiyotikler için uygun bir alternatif olarak kabul edilebileceği sonucuna varılmıştır.

Parvarei ve diğeri (2020) inaktive *Lactobacillus acidophilus* ATCC SD 5221 ve *Bifidobacterium lactis* BB-12 bakterilerini yogurda fermentasyon öncesi ve sonrası eklemiş ve paraprobiyotik ilavesinin mikroyapıya etkisini incelemiştir. Fermentasyon öncesi eklenen paraprobiyotikleri içeren yogurtlar daha açık ve daha büyük gözenek boyutuna sahip olmuş ve probiyotik yogurtlara göre farklı bir yapı göstermiştir. Fermentasyon sonrası eklenen paraprobiyotikleri içeren yogurtlar daha kompakt bir yapının yanı sıra açık ve gevşek bir yapıya sahip olmuştur. Probiyotik ve paraprobiyotik içermeyen yogurt örneklerinde açık ve süngerimsi bir yapı gözlenmiştir. Fermentasyondan önce eklenen inaktive *L. acidophilus* ATCCSD 5221 ve *B. lactis* BB-12 hücrelerini içeren örnek, ekzopolisakkarit ve hücre bileşenlerinin varlığından dolayı en düşük sinerez, en yüksek su tutma kapasitesi ve en yüksek görünür viskoziteye sahip olmuştur.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

Analizlerde temel probiyotik olarak kullanılan *Lactobacillus acidophilus* LA-5, Chr. Hansen firmasından (nu-trish® LA-5®, Kopenhag, Danimarka) tedarik edilmiştir. Bu probiyotığın gelişebilmesi için gerekli ortam MRS broth (Millipore, Merck, Darmstadt, Almanya) ile sağlanmıştır. Manyetik karıştırıcılı ısıtıcı (C-MAG HS10, IKA®-Werke GmbH ve Co. KG, Staufen Almanya) yardımıyla çözdürülen MRS agarın (Millipore, Merck, Darmstadt, Almanya) kullanılması ile mikroorganizmaların petrielerde büyümesi ve daha sonrasında da sayılması sağlanmıştır. Seyreltme işlemleri için peptonlu su (Biokar, 1 g/L) kullanılmıştır. Her seyreltme aşamasında vorteks (622.01.001, Isolab, Eschau, Almanya) kullanılmıştır. Probiyotiklerin gelişmesi için gerekli ortam inkübatörle (MSI 55, Mikrotest, Ankara, Türkiye) sağlanmıştır. Analizlerde kullanılan bütün ekipmanların ve malzemelerin sterilize edilebilmesi için otoklav (GI54 TW, Zealway, Fujian, Çin) kullanılmıştır.

Postbiyotik elde edebilmek için seçilen inaktivasyon yöntemlerinden biri olan ısıtma işlemi için su banyosu (602.01.001, Isolab, Eschau, Almanya) kullanılmıştır. Diğer yöntem olan ultrases için ise ultrases homojenizatörü (Sonopuls HD4200, Bandelin, Berlin, Almanya) kullanılmıştır. Bu cihazla düşük hacimde çalışılabilme olanağı sunan ve en yüksek genlik değerlerinin elde edilmesine olanak tanıyan prob ile (TS 103, Bandelin, Berlin, Almanya) çalışılmıştır. Sıcaklık ölçümü için sıvıya daldırılabilen, esnek tipte ve metal kaplamalı bir prob ile (Testo, Kod: 0602 0593) ve buna uygun bir sıcaklık ölçer (Testo 922, Kod: 0563 0922) kullanılmıştır.

Probiyotik Geliştirici Aktivite (PGA) analizleri için *Lactocaseibacillus casei* 431 (nu-trish® *L.casei* 431®, Kopenhag, Danimarka) ve *Bifidobacterium* kültürü (Freeze dried cultures, Direct Bifi, CSL) kullanılmıştır. Faz ayrımları santrifüj cihazı (NF800, Nüve, Ankara, Türkiye) ile sağlanmıştır.

Örnekler naylon polyamid materyalde 0,22 µm şırınga filtreler (Isolab, Eschau, Almanya) yardımı ile filtre edilmiştir. Eppendorftaki örnekler ise çalkalayıcı (Multi Bio RS-24, Biosan, Letonya) ile karıştırılmıştır. Kısa zincirli yağ asidi (KZYA) analizleri için GC kullanılmıştır.

Antimikrobiyal aktivite analizleri için *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433) ve *Escherichia coli* (ATCC 25922) kullanılmıştır. Spektrofotometre (UV1600 PC, VWR, Radnor, PA, ABD) yardımıyla dalga boyları ölçülmüştür.

3.2. Metot

3.2.1. *Lactobacillus acidophilus* LA-5'in Aktifleştirilmesi

3.2.1.1. Seyreltme Düzeyinin Belirlenmesi

Tedarik edilen probiyotiğin spesifikasyonundan hareketle 0,1 g/10 mL broth olacak şekilde *Lactobacillus acidophilus* LA-5 hazırlanmıştır. Tartım öncesi tartım kabı, spatül, hassas tartının kendisi alkolle silinmiş ve aseptik bir çalışma ortamı sağlanmaya çalışılmıştır. Hazırlanan örnek 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası sayım için örnek, hedeflenen gelişim düzeyi gözlemlenecek düzeye kadar 10 kat seyreltilmiş ve sonrasında MRS agara dökme plak yöntemiyle ekim yapılmıştır. Ekim sonrasında inkübasyon sürecinde oksijensiz ortamı sağlamak için, ekim yapılan petriler bir kavanoza yerleştirilmiş, kavanoz içerisinde mum yakılarak havanın tüketilmesi sağlanmış ve ek olarak kavanozun ağzı streçlenerek inkübasyon bu koşullarda gerçekleştirilmiştir. 37 °C'de 48 saatlik inkübasyon sonrasında, petrilerde sayım yapılmış ve 50-100 x 10⁷ kob/mL düzeyinde mikrobiyal gelişim saptanmıştır. Her ne kadar bu sayı hedeflenen probiyotik miktarı olarak yeterli görünse de, bu miktarın 1 log düzeyinde daha arttırılarak 10⁹ düzeyinde daha net bir probiyotik sayısı elde edilmesi için ön denemelere devam edilmiştir.

3.2.1.2. Çift Katman Agar Dökümü

İlk ön denemede 10⁹ kob/mL düzeyinde probiyotik gelişimi sağlanamadığı için süreç tekrarlanmış, ancak farklı olarak ekim yapılırken çift katman agar dökülmüştür. Buna karşın, sayılan probiyotik miktarı önceki denemede elde edilenden farklı çıkmamıştır. Bu sonuçtan hareketle, işlem kolaylığı nedeniyle tek katman agar yayılarak çalışmalara devam edilmesine karar verilmiştir.

3.2.1.3. Anaerobic Jar ve Anaerobic Cult Kullanımı

Hedeflenen probiyotik gelişimi sağlanamadığından, inkübasyon sürecinde probiyotik gelişimi için gerekli atmosferin sağlanamadığı düşünülerek, anaerobik jar ve Anaerocult C kullanılarak süreç tekrarlanmıştır. Buna karşın, sayılan probiyotik miktarı önceki ön

denemelerde elde edilenden farklı çıkmamıştır. Bu sonuçtan hareketle, maliyet gerekçesiyle hava almayan bir kavanozda mum yakarak probiyotik gelişim atmosferinin ayarlanmasına karar verilmiştir.

3.2.1.4. Başlangıç Probiyotik Miktarının Arttırılması

Hedef probiyotik miktarının elde edilememesi dolayısıyla, bu sefer başlangıçta kullanılan toz organizma miktarı arttırılmıştır. 0,1 g/10 mL'nin yanı sıra, 0,2 g/10 mL ve 0,3 g/10 mL probiyotik içeren broth'lar hazırlanmıştır. Hazırlanan broth'larla ekim süreci, 1.ön denemede ki yöntemle tekrarlanmıştır (hava almayan kavanoz içerisinde mum yakarak ve petrilere tek katman agar yayarak). Yapılan işlem sonucunda yine önceki denemelerden farklı bir probiyotik sayısına ulaşamadığı görülmüştür.

3.2.1.5. Laktoz İlavesi

Son probiyotik miktarının artmamasındaki nedenlerden birisinin, probiyotik aktifleştirmede kullanılan broth ortamında bulunan karbonhidrat kaynağının yeterli olmayabileceği düşünülmüş ve broth hazırlamada 0,1 g laktoz ilavesi yapılmıştır. Bunun dışında tüm süreç, ilk denemede ki şekilde gerçekleştirilmiştir. Sonuçta, inkübasyon sonrası petrilere sayılan probiyotik miktarında logaritmik olmasa da kısmi bir azalma görülmüştür. Bundan dolayı, broth'un zenginleştirilmesine ihtiyaç olmadığına karar verilmiştir.

3.2.1.6. Spesifikasyona Uygun Uygulama

Bu çalışmada *Lactobacillus* cinsindeki *Lactobacillus acidophilus* LA-5 probiyotiği seçilmiştir. *Lactobacillus acidophilus* LA-5 Chr. Hansen firmasından (nu-trish® LA-5®, Kopenhag, Danimarka) tedarik edilmiştir. Bu mikroorganizmanın aktifleştirilmesi ve geliştirilmesi için literatürde uygun olduğu belirtilen MRS broth ve MRS agar çalışmalarda kullanılmıştır.

Probiyotik bakteriler üretici firmanın önerisine dayanarak 10^9 kob/mL düzeyinde canlılığa ulaşılacak miktarda tartılmış (0,01 g/mL) ve sterilize edilmiş MRS broth besiyerinde 37 °C'de 24 saat soğutmalı bir inkübatörde (MSI 55, Mikrotest, Ankara, Türkiye) inkübe edilmiştir. MRS broth 52,2 g/L olacak şekilde peptonlu su (Biokar, 1 g/L) içinde eritilmiş, amaca uygun kaplara dağıtılmış otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

Çalışmalarda kullanılan her çeşit akışkanın (hazırlanan çözeltilerin, besiyerlerinin, seyreltik organizmaların vb) karıştırılmasında vorteks (622.01.001, Isolab, Eschau, Almanya)

kullanılmıştır. Agar hazırlanmasında ise MRS agar (Millipore, 68,2 g/L) kullanılmıştır. Agar, ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (C-MAG HS10, IKA®-Werke GmbH ve Co. KG, Staufen Almanya) yardımıyla karıştırılmış ve daha sonrasında herhangi bir bulaşı etkeninin ortadan kaldırılması amacı ile otoklavlanmıştır (GI54 TW, Zealway, Fujian, Çin). Otoklavlanan agar 55 °C’de muhafaza edilmiştir.

Seyreltilmiş olan *L. acidophilus* LA-5’in uygun dilüsyonları petrilere aktarılmış ve agar dökülerek karıştırılmıştır. Sonrasında 37 °C’de inkübatörde, mum yakılarak oksijensiz bir ortam hazırlanmış kavanozlarda, 48 saat muhafaza edilmiş ve led ışık üstünde sayım yapılmıştır.

3.2.2. Isıl İşlem ile İnaktivasyon

Isıl işlemler su banyosunda (Isolab, 602.01.001) farklı sıcaklık (65-95 °C aralığı) ve sürelerde (5-90 dakika aralığı) gerçekleştirilmiştir. 10^9 kob/mL düzeyinde probiyotik içeren MRS broth ısıl işlem için belirlenmiş olan işlem sıcaklığına ulaştıktan sonra işlem süresinin başlatılmasına karar verilmiştir.

Her koşul için ayrı ayrı broth’lar hazırlanmıştır. Brothlar otoklavlandıktan ve belirlenen miktarda *Lactobacillus acidophilus* LA-5 ilave edildikten sonra 37 °C’de 24 saat inkübatörde bekletilmiş ve probiyotik mikroorganizmaların gelişmesi sağlanmıştır. Su banyosuna bırakılan örneklerin işlem sıcaklığına ulaşması için gerekli süre belirlenmiştir. Örnekler su banyosuna bırakıldıktan ve hedef sıcaklığa ulaştıktan sonra işlem süresi başlatılmıştır. Örnekler su banyosuna su seviyesi tüpteki broth seviyesini kaplayacak şekilde tüplüklere dizilerek işlem gerçekleştirilmiştir. Sonrasında, LA-5 içeren bu broth’lar Tablo 3.1’de sunulan deneme planına göre farklı sıcaklık ve sürelerde su banyosunda (602.01.001, Isolab, Eschau, Almanya) bekletilerek ısıya maruz bırakılmış ve bu şekilde probiyotiklerin inaktivasyonu sağlanmıştır. İnaktive edilen brotlardaki canlı probiyotik sayısının belirlenmesi için MRS agara ekimler gerçekleştirilmiş ve inkübasyon sonrası sayımlar yapılmıştır.

Tablo 3.1 Isıl İşlem ile İnaktivasyon Çalışma Planı

Üretim No	Isıl İşlem	
	Sıcaklık (°C)	Süre (dak)
1	65	30
2	65	45
3	65	60
4	65	90
5	75	15
6	75	30
7	75	45
8	75	60
9	85	10
10	85	15
11	85	30
12	85	45
13	95	5
14	95	10
15	95	15
16	95	30

3.2.3. Ultrases ile İnaktivasyon

Bu çalışmada ultrases ile probiyotiklerin ölümlerinin gerçekleştirilerek, elde edilecek postbiyotiklerin aktivite özelliklerinin ortaya konulması ve bu şekilde ısıl işlemle ultrases işleminin kullanılmasından kaynaklanabilecek farklılıkların ortaya konulması düşünülmüştür. Bu kapsamda, ultrases işlemleri için Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Gıda Mühendisliği laboratuvarlarında bulunan ultrases homojenizatörü (Sonopuls HD 4200, Bandelin, Berlin, Almanya) kullanılmıştır. Bu cihazla 20 kHz sabit frekansta ultrases dalgaları üretilirken, dalgaların genlik değerleri ayarlanabilmekte ve bu şekilde akışkana aktarılan ultrases şiddeti değiştirilebilmektedir. Bu cihaz ile uyumlu olan problar içerisinde, düşük hacimde çalışılabilme olanağı sunan ve en yüksek genlik değerlerinin elde edilmesine olanak tanıyan prob (TS 103, Bandelin, Berlin, Almanya) kullanılarak denemeler gerçekleştirilmiştir. Bu prob ile 5-90 mL arası hacimlerde çalışılabilir. Ayrıca, bu prob ile yüzde değerlerle ifade edilen farklı değerlerde genlik ayarlanmakta (%20-65 aralığında ayar yapılabilir) ve bu genlik değerleri 98-320 μ m aralığına denk gelmektedir. Firma ile yapılan yazışmalarda,

ilgili prob ile çalışılırken cihazdaki minimum ayar değeri olan %20 genlik ayarlaması ile 98 µm, %35 genlik ayarlaması ile 172 µm, %50 genlik ayarlaması ile 246 µm ve cihazdaki maksimum ayar değeri olan %65 genlik ile ise 320 µm genlik değerleri elde edilebildiği bilgisi edinilmiştir.

Bu yöntem için de ısıtma işlemde olduğu gibi 16 farklı üretim koşulu belirlenmiştir. (Tablo 3.2)

Lactobacillus acidophilus LA-50, 1×10^{-12} g/mL düzeyinde yapılacak seyreltmelerle üretildiğinde, 10^5 - 10^6 kob/mL düzeylerinde canlılığın elde edilebileceği belirlenmiştir. İşlemler boyunca örnek sıcaklıklarının 60-65 °C aralığında tutulmuş ve bunu sağlayabilmek için karlı su kullanılmıştır.

Tablo 3.2 Ultrases ile İnaktivasyon Çalışma Planı

Üretim No	Ultrases İşleme	
	Genlik (µm)	Süre (dak)
1	98	15
2	98	30
3	98	45
4	98	60
5	172	15
6	172	30
7	172	45
8	172	60
9	246	15
10	246	30
11	246	45
12	246	60
13	320	15
14	320	30
15	320	45
16	320	60

3.2.4. Probiyotik Geliştirici Aktivite

Probiyotik gelişimini arttırıcı aktivite analizindeki temel amaç, postbiyotiklerin probiyotik niteliği bilinen mikroorganizmaların bulunduğu ortama ilave edilmesi durumunda, probiyotiklerin gelişimini arttırıp arttırmadığını, arttırıyorsa bu artışın düzeyini belirlemektir.

Bu organizmalar 10^5 - 10^6 kob/mL düzeyinde canlılığa ulaşılacak miktarda tartılmış (*Lactocaseibacillus casei* 431 için $0,1 \times 10^{-10}$ g/mL ve *Bifidobacterium* kültürü için $0,1 \times 10^{-4}$ g/mL), kontrole %5 hacimce sadece broth, karşılaştırılmak istenen örnekler ise %5 postbiyotik ilave edilmiş ve sterilize edilmiş MRS broth besiyerinde 37 °C’de 24 saat süreyle soğutmalı bir inkübatörde (MSI 55, Mikrotest, Ankara, Türkiye) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında broth’dan örnekler petrilere ekilmiş ve üzerine MRS agar ilave edilip, 37 °C’de 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. MRS broth 52,2 g/L olacak şekilde peptonlu su (Biokar, 1 g/L) içinde eritilmiş, amaca uygun kaplara dağıtılmış, otoklavda 121 °C’de 15 dakika sterilize edilmiştir. Agar hazırlanmasında ise MRS agar (Millipore, 68,2 g/L) kullanılmıştır. Agar, ısıtıcı manyetik karıştırıcı (C-MAG HS10, IKA®-Werke GmbH ve Co. KG, Staufen Almanya) yardımıyla karıştırılmış ve daha sonrasında herhangi bir bulaşı etkeninin ortadan kaldırılması amacı ile otoklavlanmıştır (GI54 TW, Zealway, Fujian, Çin). Otoklavlanan agar 55 °C’de muhafaza edilmiştir. Ayrıca, *Lactocaseibacillus casei* 431 ile çalışılırken, ekim sonrasında inkübasyon sürecinde oksijensiz ortamı sağlamak için, ekim yapılan petrilere bir kavanoza yerleştirilmiş, kavanoz içerisinde mum yakılarak havanın tüketilmesi sağlanmış ve ek olarak kavanozun ağzı streçlenerek inkübasyon bu koşullarda gerçekleştirilmiştir. *Bifidobacterium* kültürü için ise anaerobic jar ve anaerocult A kullanılarak ortamın tamamen oksijensiz olması sağlanmıştır.

3.2.5. Antimikrobiyal Aktivite

Postbiyotiklerin kolon mikrobiyotası üzerinde etki gösterebilecekleri konulardan birisinin de antimikrobiyal aktiviteleri olabileceği bilindiğinden, tez çalışması kapsamında üretilmiş olan postbiyotiklerin çeşitli patojen bakteriler üzerindeki potansiyel antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi planlanmıştır. Antimikrobiyal aktivite analizleri için patojen bakteriler olarak *Escherichia coli* ve *Enterococcus faecalis* seçilmiştir.

Öncelikle pasajda kullanmak için tüplere 8 mL olacak şekilde Tryptic Soy Broth (TSB) hazırlanıp otoklavlanmıştır. Çalışma kapsamında kullanılacak patojen bakterilerden (*Escherichia coli* ve *Enterococcus faecalis*) 1’er mL alınıp, taze TSB içerisine ilave edilmiş ve 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Bu döngü taze kültürler elde etmek adına en az 2 kez tekrarlanmıştır (bulanıklığa göre ortalama 3 pasaj). Hazırlanan örnekler, cam tüpten önceden otoklavlanmış falkon tüpe aktarıldıktan sonra oda sıcaklığında 8000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir (NF800, Nüve, Ankara, Türkiye). Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış ve

Çöken kısma %0,85'lik steril tuzlu su ilave edildikten sonra karışım spektrofotometrede (UV1600 PC, VWR, Radnor, PA, ABD) 600 nm'de ölçölmüştür. Ölçömlerde 0,5 absorbans değeri elde edilene kadar tuzlu su ile seyreltmeye devam edilmiştir. Mc Farland 0,5'e (10⁸ mikroorganizma/mL) göre ayarlanarak standart bir bulanıklık oluşturulmuştur. Belirlenen düzeydeki bulanıklığı ayarladıktan sonra patojen bakteri örneklerinden 80 µL alınıp 8 mL'lik TSB'lere ilave edilmiştir. Kontrol grubuna sadece spektrofotometrede bulanıklığı ayarlanmış bakteri ilave edilirken, postbiyotik etkisinin gözlemlenmesi için hazırlanan örneklere %5 düzeyinde postbiyotik ilave edilmiştir. MRS broth'da hazırlanan örnekler 37 °C'de, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası örnekler 8000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir (NF800, Nüve, Ankara, Türkiye). Santrifüj sonrasında, örneklerin süpernatantı dökölmüş ve dipte kalan kısma %0,85'lik 30 mL tuzlu su ilave edilerek katı kısım çözöndürölmüştür. Tuzlu suda çözöndürölmüş bu çözelti spektrofotometrede (UV1600 PC, VWR, Radnor, PA, ABD) 600 nm'de okunmuştur (A_{örnek}). Tüplere ilave edilen postbiyotiğın kendisinden kaynaklanan bulanıklığı saptamak için, MRS broth'a ilave edilen postbiyotik hacmi olan 400 µL bir eppendorf'a alınmış, 8000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantı dökölüp, üzerine %0,85'lik 30 mL tuzlu su eklenerek çözöndürölüp, 600 nm'de absorbansı okunmuştur (A_{postbiyotik}). Antimikrobiyal aktivitenin saptanmasında ise aşğıdaki formölden yararlanılmıştır:

$$AA (\%) = \frac{(A_{kontrol} - (A_{örnek} - A_{postbiyotik}))}{A_{kontrol}} \times 100$$

3.2.6. Kısa Zincirli Yağ Asidi

Probiyotik mikroorganizmalar 10⁵-10⁶ kob/mL düzeyinde canlılığa ulaşılacak miktarda tartılmış (*Lacticaseibacillus casei* 431 için 0,1 x 10⁻¹⁰ g/mL ve *Bifidobacterium* költürü için 0,1 x 10⁻⁴ g/mL), kontrole %5 hacimce sadece broth, karşılaştırılmak istenen örneklere ise %5 postbiyotik ilave edilmiş ve sterilize edilmiş MRS broth besiyerinde 37 °C'de 24 saat süreyle soğutmalı bir inkübatörde (MSI 55, Mikrotest, Ankara, Türkiye) inkübe edilmiştir. 24 saat sonrasında, örnekler 10000 rpm 5 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Ardından gözenekliliğı 0,22 µm olan, naylon polyamidten yapılmış şırınga filtreler (Isolab, Eschau, Almanya)

yardımı ile, santrifüj edilen örneğin süpernatantı filtre edilmiştir. Her işlem koşulundan 250 µL alınarak eppendorflara aktarılmış ve 200 µL HCl ile tamamlanmıştır. Eppendorflar 1 dakika süre ile vorteks yardımı ile karıştırıldıktan sonra her birine 10 µL iç standart ve 1 mL dietil eter eklenmiştir. Eppendorfların kapakları parafilm ile iyice kapatıldıktan sonra yarım saat boyunca karışmaları için çalkalayıcıya (Multi Bio RS-24, Biosan, Letonya) bırakılmışlardır. Karışma işlemi tamamlandıktan sonra ise 10000 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüjleri sağlanmıştır. Süpernatantlardan 1 mL alınarak GC'de işlem görmek üzere viallere aktarılmışlardır.

KZYA belirlenmesinde alev iyonizasyon dedektörlü (FID) gaz kromatografi (GC-FID) cihazından (7890A, Agilent Technologies, Santa Clara, ABD) faydalanılmıştır. GC'de ayırım için DB-FFAP (30 m x 0.25 µm x 0.25 mm, Agilent) kolon kullanılmıştır. GC fırın sıcaklığı başlangıçta 90 °C'ye ayarlanmış, bu sıcaklıkta 1 dakika tutulmuş, ardından 7 °C/dk artışla 160 °C'ye getirilmiş ve 1 dakika tutulmuş, sonrasında 40 °C/dk artış ile 240 °C'ye getirilmiş ve bu sıcaklıkta da 2 dk tutulmuştur. Taşıyıcı gaz olarak helyumdan yararlanılmıştır. Helyum akışı (septum purge flow) 3 mL/dk olup her bir ekstraktan 2 µL enjekte edilmiş ve split kullanılmadan analizler yapılmıştır. Enjeksiyon bloğu sıcaklığı 250 °C, FID sıcaklığı 260 °C'ye ayarlanmıştır. Analizlerde miktar hesaplamasında iç standart yönteminden yararlanılmıştır. İç standart olarak, 4-metilvalerik asit (her biri için 0.5 mg/mL) kullanılmıştır. Analiz sonucu SYA bileşimlerinin miktarı ng/mL olarak ifade edilmiştir.

3.2.7. İstatistiksel Analizler ve Değerlendirme

Üretilen postbiyotiklerin analizleri sonucunda elde edilen verinin istatistiksel analizi ve değerlendirilmesinde SPSS İstatistik Paket Programı (IBM SPSS Statistics Ver. 22, SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) kullanılmıştır. İncelenen postbiyotiklerin üretim koşullarıyla özelliklerindeki değişimin anlamlı farklılıklar yaratıp yaratmadığının incelenmesinde ve örneklerin gruplandırılmasında ANOVA ve Duncan Post Hoc testlerinden yararlanılmıştır. Üretilmiş olan tüm postbiyotiklerin ve özelliklerinin toplu olarak değerlendirilmesinde ise Temel Bileşen Analizi'nden (TBA) yararlanılmış, bu analiz için XLSTAT 2023.1.6 (Addinsoft, New York, NY, ABD) kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. İnaktivasyon Yöntemlerinin Probiyotikler Üzerine Etkisi

4.1.1. Isıl İşlem ile İnaktivasyon Yönteminin Probiyotikler Üzerine Etkisi

Sayım sonuçlarına göre probiyotiklerin tüm koşullarda tamamen öldürüldüğü görülmüştür. Bu amaçla, MRS agarlara yapılmış ekim ve inkübasyon sonrası petrilerdeki sayım sonuçları Tablo 4.1’de, başlangıç organizma sayılarını göstermek üzere herhangi bir ısıtma işlemine tabi tutulmayan örneklerin petrilerinden alınan örnek görüntüleri Ek A1’de, ısıtma işlem görmüş örneklerin ekildiği petrilerden alınan görüntüleri ise her bir sıcaklık için örnek olarak Ek A2-5’te sunulmuştur.

Lactobacillus acidophilus LA-5 suşunun belirli sıcaklık ve inkübasyon sürelerinde su banyosunda bekletildikten sonra canlılık durumları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, mikroorganizmaların ısıtma işlem uygulamalarına karşı duyarlılıklarını açıkça göstermektedir (Tablo 4.1).

Kontrol gruplarında, herhangi bir ısıtma işlem uygulanmayan *Lactobacillus acidophilus* LA-5 suşlarının sayıları gözlemlenmiştir. 65 °C, 75 °C, 85 °C ve 95 °C’de kontrol grupları sırasıyla $98,50 \pm 9,19 \times 10^7$, $119,00 \pm 12,73 \times 10^7$, $229,50 \pm 4,95 \times 10^7$ ve $54,50 \pm 4,95 \times 10^7$ kob/mL olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, ısıtma işlem uygulanmayan mikroorganizmaların yüksek bir canlılık oranına sahip olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.1’de görüldüğü gibi, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 suşu, 65 °C ve üzeri sıcaklıklarda belirli sürelerde inkübasyon sonrasında tamamen inaktive olmuştur. 65 °C’de 30 dakika süreyle bekletilen örneklerde canlı bakteri sayısı tespit edilememiştir. Bu durum, daha yüksek sıcaklıklar için de geçerli olup, 75 °C’de 15 dakika ve daha uzun sürelerde inkübasyon yapılan örneklerde de canlı bakteri tespit edilememiştir. 85 °C ve 95 °C sıcaklıklarda ise inaktivasyon daha kısa sürede gerçekleşmiştir.

Tablo 4.1 Belirli işlem sıcaklıklarında ve sürelerde su banyosunda bekletilen *Lactobacillus acidophilus* LA-5 mikroorganizmaların ve kontrollerinin ekimden 48 saat sonraki sayım sonuçları.*

İşlem Sıcaklığı (°C)	İnkübasyon Süresi (dk)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (kob/mL)
65 °C	Kontrol	98,50 ± 9,19 x 10 ⁷
	30	TE
	45	TE
	60	TE
	90	TE
75 °C	Kontrol	119,00 ± 12,73 x 10 ⁷
	15	TE
	30	TE
	45	TE
	60	TE
85 °C	Kontrol	229,50 ± 4,95 x 10 ⁷
	10	TE
	15	TE
	30	TE
	45	TE
95 °C	Kontrol	54,50 ± 4,95 x 10 ⁷
	5	TE
	10	TE
	15	TE
	30	TE

* Kontrol olarak sunulan değerler, ısıl işlem görmemiş petrilerdeki sayım sonuçlarıdır. Sayılabilir bir değer bulunmayan petrilerdeki sonuçlar “TE” olarak verilmiştir.

Isıl işlemle *Lactobacillus acidophilus*'un inaktivasyonunu inceleyen diğer çalışmalar da benzer sonuçlar sunmaktadır. Sawada ve diğerleri (2016), *Lactobacillus gasseri* CP2305'in ısıl işlemle inaktive edilmesinin gastrointestinal fonksiyon üzerindeki düzenleyici etkilerini araştırmışlardır. Çalışmalarında, 69 °C'de 1 saniye ve 95 °C'de 30 saniye süreyle ısıl işlem uygulanmış ve bu işlemler sonrasında bakteri hücrelerinin tamamen inaktive edildiği rapor edilmiştir. Bu sonuçlar, çalışmamızda 65 °C ve 95 °C'de ısıl işleme tabi tutulan *Lactobacillus acidophilus* LA-5 hücrelerinin yaşama yetisinin tamamen kaybolmasıyla uyumludur. Isıl işlemle inaktive edilen CP2305'in bağırsak fonksiyonlarını düzenleyici etkileri olduğu ve

KZYA üretimini artırdığı görülmüştür (Sawada, Sugawara, Ishida, Aihara, Aoki, Takehara ve Fujiwara, 2016).

Almada ve diğerleri (2021) çalışmasında, *Bifidobacterium animalis* suşlarının inaktivasyonu için ısıtıl işlemler kullanılmış ve bu işlemlerin probiyotiklerin fonksiyonel özelliklerini koruyarak gıda matriksine entegre edilebileceği belirtilmiştir. Çalışmamızda 65 °C, 75 °C, 85 °C ve 95 °C sıcaklıklarda yapılan ısıtıl işlemlerle elde edilen sonuçlar, bu çalışmanın bulgularıyla uyumludur. Isıl işlem sonrası sayılabilir miktarda bakteri kalmamıştır.

Maehata ve diğerleri (2021), ısıtıl işlemle inaktive edilmiş *Lactocaseibacillus paracasei* MCC1849'un bağışıklık modüle edici etkilerini araştırmış ve bu tür inaktive edilmiş probiyotiklerin sağlık yararları sağlayabileceğini belirtmişlerdir. Isıl işlemle inaktive edilmiş MCC1849, yüksek düzeyde interlökin-12 (IL-12) üretimini teşvik ederek bağışıklık sistemini modüle etmiştir. Bu bulgular, çalışmamızda ısıtıl işlemle inaktive edilen *Lactobacillus acidophilus* LA-5'in potansiyel bağışıklık modüle edici etkileri olabileceğini düşündürmektedir (Maehata, Arai, Iwabuchi ve Abe, 2021).

4.1.2. Ultrases ile İnaktivasyon Yönteminin Probiyotikler Üzerine Etkisi

Öncelikle elimizdeki cihaz ve prob koşullarında 10 mL'lik akışkanlara farklı koşullarda işlem uygulandığı sıcaklığın nasıl değiştiği belirlenmeye çalışılmıştır. Bu doğrultuda, ilk olarak 10 mL'lik saf su ile çalışılmış ve farklı genliklerde uygulanan ultrases işlemi sonrasındaki sıcaklıklar ölçülmüştür. Bazı işlemlerde soğutma uygulanmıştır. Soğutma uygulamasında, işlem yapılan test tüpü, içerisinde kar bulunan bir şişenin içerisine yerleştirildikten sonra ultrases işlem gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2 Farklı koşullarda uygulanan ultrases işleminin 10 mL'lik saf sudaki etkileri.*

Genlik (μm)	İşlem Süresi (dk)	Vurgu	Soğutma	Sıcaklık (°C)
320	1	-	-	50,0
320	2	Var	-	40,0
98	1	-	-	34,0
320	1	-	Karla	35,0
320	2	Var	Karla	32,0
98	1	-	Karla	12,6

* Vurgulu işlemde, 1 saniyelik ultrases işlemi yapıldıktan sonra işlem 1 saniyeliğine durdurulmuştur.

Daha sonrasında ise aynı işlemler broth ile tekrarlanarak sıcaklıklar ölçülmüştür. Tablo 4.3'te de görüldüğü üzere broth ortamında ultrases işlemi uygulandığında sıcaklık çok daha belirgin şekilde artmaktadır.

Tablo 4.3 Farklı koşullarda uygulanan ultrases işleminin 10 mL'lik saf sudaki etkileri.*

Genlik (μm)	İşlem Süresi (dk)	Vurgu	Soğutma	Sıcaklık (°C)
320	1	-	-	53,1
320	2	Var	-	50,5
98	1	-	-	38,2
320	1	-	Karla	46,8
320	2	Var	Karla	37,1
98	1	-	Karla	29,8

* Vurgulu işlemde, 1 saniyelik ultrases işlemi yapıldıktan sonra işlem 1 saniyeliğine durdurulmuştur.

Bu sonuçlardan hareketle, ultrases ön denemeleri için ilk işlem koşulları oluşturulmuş ve denemelere başlanmıştır. İşlenecek 10 mL'lik örnekler cam tüpte hazırlanmıştır. İşlenmeden önce örnekler 15 mL'lik falkon tüpüne aktarılmıştır. Ultrases probunun ucu örneğin yarısına denk gelecek şekilde daldırılarak işlem uygulanmıştır. Sıcaklık probu işlem öncesinde alkolle silinmiş ve işlem süresince örnek içerisinde tutulmuştur. Ultrases probunun tüp yüzeyine temas etmemesi önemlidir, çünkü temas halinde uzun işlem sürelerinde tüpü eritebilmektedir. Bunun yanı sıra, ultrases probu ile sıcaklık probunun birbirine temas etmemesi de önemlidir.

(temas halinde ultrases probunda aşınmalar olabilmekte ve sıcaklık probu da gerçek dışı yüksek sıcaklıklar ölçebilmektedir) ve bu nedenle farklı çözümler üretilmeye çalışılmıştır.

Ultrases işlemi sırasında sıcaklığın düşük tutulabilmesi için örneği içeren tüpler beher içerisindeki karda tutularak soğutulmuştur. İlk deneme setinde probiyotik konsantrasyonu 0,1 g/10 mL iken 10 mL'lik broth'lar tüplere konulmuş ve ultrases probu daldırılarak ultrases işlemleri gerçekleştirilmiştir. İlk deneme setinde vurgulu bir işlem yapılmıştır (1 saniye ultrases işlemi, sonrasında 1 saniye durma şeklindeki döngülerle). Bu şekilde 98 µm genlikte 30 dakika, 172, 246 ve 320 µm'lerde ise 20'şer dakikalık işlemler gerçekleştirilmiştir. Bu koşullarda yapılan işlemler sonrasında logaritmik düzeylerde ölümler gerçekleştirilememiştir.

İşlem süresinin uzatılması denenmiştir. Bu doğrultuda, 98 µm genlikte 40 dakika, 172, 246 ve 320 µm'lerde ise 30'ar dakikalık işlemler gerçekleştirilmiştir. Ancak, bu koşullarda da logaritmik bir ölüm saptanamamıştır.

Vurgulu işlem yerine sıcaklığın artması göz önüne alınarak sürekli ultrases işlemi uygulanmıştır. Bu şekilde aynı sürede 2 kat daha yüksek enerjinin aktarılabilmesi mümkün olmaktadır. Yapılan diğer ön denemelerde gözlemlenen şekilde, karın soğuk suyla desteklenmesi durumunda tüplerle temas yüzeyi arttığından daha etkin soğutma sağlandığı gözlemlenmiştir. 1 log düzeyinde azalmalar saptanmıştır.

Yapılan ön denemeler sırasında, sıcaklığın kontrol edilemediği ve yükseldiği koşullarda çok daha etkin ölümlerin gerçekleşebildiği gözlemlenmiştir. Buradan hareketle, öncelikle işlem sıcaklığının kontrollü olarak yükseltilmesi planlanmıştır. Ancak, cihaz sıcaklık ayarı yapabilen değil, sadece verilen sıcaklık değeri aşıldığında sistemi durduran bir niteliktedir. Bundan dolayı, ultrases işlemi sırasında örnek sıcaklığını sabitlemek için ek ön denemeler yapılması gerekmiştir. Bu amaçla öncelikle düşük genlikte işlemler denenmiştir. Örneklerin sıcaklığını sabit tutmak için cam tüp, beher içerisinde sabitlenerek tüp kar, karlı su, soğuk su veya çeşme suyu içerisinde tutularak işlenmiştir. 98 µm genlikte çeşme suyu içerisindeki örnek 2 dakikada ortalama 45 °C'ye çıkmıştır. 3,5 dakikanın sonunda 60 °C'ye ulaşmıştır. 172 µm genlikte soğuk su içerisindeki örnek ortalama 2 dakikanın sonunda 60 °C'ye ulaşmıştır. 246 µm genlikte soğuk su içerisindeki örnek ortalama 30 saniyede 60 °C'ye ulaşmıştır. Bu verilerle farklı genliklerde farklı soğutma ortamları kullanarak sıcaklığın dengelenmeye çalışılmasına, hedeflenen sıcaklık aşıldığında ise cihaz sayesinde sistemin

durdurulmasına çalışılmıştır. Sistem durdurulduktan sonra örnek sıcaklığı hedef sıcaklığın 5 °C altına indikten sonra tekrar çalıştırılmıştır.

Buna göre, örnek sıcaklığı 50 °C'yi aşmayacak şekilde bir ultrases işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem bir önceki denemede olduğu gibi 98 µm genlikte 40 dakika, 172, 246 ve 320 µm'lerde ise 30'ar dakikalık sürekli işlemler olacak şekildedir ve soğutma yukarıda açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde, 2-3 log aralığında probiyotik sayısında azalmalar elde edilmiştir.

Buradan hareketle 50 °C'nin yetersiz kaldığına karar verilmiş ve hem sıcaklığın 60 °C'ye yükseltilmesi hem de örnek hacminin yarıya (5 mL) düşürülmesi denenmiştir. Bu doğrultuda, 0,1 g/10 mL'lik ve 0,05 g/5 mL'lik olmak üzere iki farklı örnek ile çalışmalara devam edilmiştir. Bu denemede çok daha olumlu sonuçlar alınmakla beraber, ultrases probu bozulmuştur. Bozulmanın nedeni, 5 mL'lik düşük hacimde, hem ultrases probu hem de sıcaklık probu, çok uğraşılmasına rağmen birbirine temas etmeden yerleştirilememiştir. Bunun sonucunda, ultrases probu aşınmış ve kullanılamaz hale gelmiştir.

Probun bozulmasından dolayı, sıcaklık ölçümü için farklı seçenekler değerlendirmeye alınmıştır. Sıcaklık ölçümü için sıvıya daldırılabilen, esnek tipte ve metal kaplamalı bir prob ile (Testo, Kod: 0602 0593) ve buna uygun bir sıcaklık ölçer ile (Testo 922, Kod: 0563 0922) çalışmanın uygun olacağına karar verilmiştir. Aynı zamanda bozulan probun yerine yenisi tedarik edilmiştir.

Ultrases probunun değişmesinden kaynaklı olarak bazı deneysel değişimlerin olup olamayacağından da emin olunmadığından, ultrases işleme sırasında sıcaklığın 60 °C'yi aşmayacak şekilde ayarlandığı, örnek hacminin 10 mL olduğu koşullarda 172 ve 320 µm genlikte 45'er dakikalık 2 koşul çalışılmıştır (Ek A6). Kontrol ekimlerinde $34,50 \pm 3,27 \times 10^7$ kob/mL düzeyinde canlı probiyotik sayılarına ulaşılmıştır. Bu deneme setinde 7×10^4 ile 13×10^4 kob/mL aralığında koloni saptanmıştır. Bir başka ifadeyle, yaklaşık 4 log düzeylerinde probiyotik canlılığında azalma belirlenmiştir.

Yeni düzenekle 4 log düzeyinde elde edilen probiyotik ölümünü arttırmak için ultrases işlem süresi, 60 dakikaya çıkarılmıştır. Ultrases işleme sırasında sıcaklığın 60 °C'yi aşmayacak şekilde ayarlandığı, örnek hacminin 10 mL olduğu koşullarda 172 ve 320 µm genlikte 60'ar

dakikalık 2 koşul çalışılmıştır (Ek A7). Kontrol ekimlerinde $58 \pm 12 \times 10^8$ kob/mL düzeyinde canlı probiyotik sayılarına ulaşılmıştır. Bu deneme setinde ultrases işleme sonrasında 17×10^4 ile 62×10^4 kob/mL aralığında koloni saptanmıştır. Bir başka ifadeyle, bir önceki deneme setine oldukça yakın düzeylerde (4 log düzeylerinde) probiyotik canlılığında azalma belirlenmiştir.

Ultrases işleme süresinin arttırılmasına rağmen probiyotik ölüm düzeyinde artış olmaması üzerine bir önceki analiz setindeki ultrases işleme koşullarının tekrar denenmesine karar verilmiştir. Buna ek olarak, sıcaklığın $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlandığı bir ultrases işlem koşulunun da denemesi kararlaştırılmıştır. Bunun nedeni, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakikalık ısıtma işlemi çalışılmakta olan probiyotiğin (*Lactobacillus acidophilus* LA-5) tam ölümünün gerçekleştirilebildiğinin çalışmaların ilk aşamalarında saptanmış olmasıdır. Her ihtimale karşı, bu ön deneme setinde hazırlanan probiyotikten birer set de $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakikalık ısıtma işlemi sokulmuştur ve eski denemelerde olduğu gibi tam ölümün olup olmayacağı gözlemlenmiştir.

Önceki denemelerde 0,01 g/mL düzeyinde mikroorganizma kullanılarak hazırlanan probiyotik, bu ön deneme setinin ilk grubunda 10 kat, ikinci grubunda ise 10^7 kat seyreltilerek kullanılmıştır. Her iki grubun kontrol ekimlerinde 5 ile 7×10^7 kob/mL düzeylerinde canlı probiyotik sayılarına ulaşılmıştır.

Yapılan ön deneme sonuçları Ek A8 ve Ek A9'da sunulmuştur. Buna göre; birinci sette (başlangıç probiyotik konsantrasyonu $0,1 \times 10^{-2}$ g/mL) $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakikalık ısıtma işlemi işlenmiş örnek, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 60 dakikalık ultrases işlemi ile 320 μm genlikte işlenmiş örnek, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 60 dakikalık ultrases işlemi ile 320 μm genlikte işlenmiş örnek üretilmiştir (Ek A8). İkinci sette ise (başlangıç probiyotik konsantrasyonu $0,1 \times 10^{-7}$ g/mL) $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakikalık ısıtma işlemi işlenmiş örnek ve $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 60 dakikalık ultrases işlemi ile 320 μm genlikte işlenmiş örnek üretilmiştir (Ek A9).

Her iki sette de $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakikalık ısıtma işlemi işlenmiş örneklerde tam ölümün gerçekleştirilebildiği görülmüştür. Buna karşın, birinci sette 320 μm genlikte 60'şar dakikalık ultrases işlemi ile hem $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de hem de $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de işlenen örneklerde ise tam ölümün sağlanamadığı, $2,5 \times 10^2$ ile 13×10^2 kob/mL aralığında koloni canlılığı saptandığı görülmüştür. Bir başka ifadeyle, bu koşullarda bile ancak 5 log düzeylerinde probiyotik ölümü elde edilebilmiştir (Ek A8). İkinci sette 320 μm genlikte $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 60 dakikalık ultrases

işlemi ile ise $39,5 \pm 1,5$ kob/mL düzeyinde probiyotik canlılığı saptanırken, bu setteki probiyotik ölüm düzeyi 5 log'un üzerine çıkmış ancak 6 log'a ulaşmamıştır.

Bundan hareketle, *Lactobacillus acidophilus* LA-5'in başlangıç probiyotik canlılık düzeyi 10^5 - 10^6 kob/mL aralığına çekilmesi için kullanılması gerekli konsantrasyonun belirlenmesi için bir deneme ekilmiştir (Ek A10). Buna göre, *Lactobacillus acidophilus* LA-50, 1×10^{-12} g/mL düzeyinde yapılacak seyreltmelerle üretildiğinde, 10^5 - 10^6 kob/mL düzeylerinde canlılığın elde edilebileceği belirlenmiştir (Tablo 4.4) ve tez çalışmasının devamında bu konsantrasyonların kullanılmasına karar verilmiştir.

Tablo 4.4 *Lactobacillus acidophilus*'un farklı seyreltme düzeylerinde aktifleştirilmesi.

	Probiyotik Sayısı (kob/mL)		
	a	b	c
$0,1 \times 10^{-4}$ g/mL	SD	$316,0 \pm 45,3$	$4,5 \pm 0,7$
$0,1 \times 10^{-8}$ g/mL	SD	$423,0 \pm 32,5$	$6,5 \pm 3,5$
$0,1 \times 10^{-12}$ g/mL	$418,0 \pm 48,1$	$5,5 \pm 0,7$	TE
$0,1 \times 10^{-16}$ g/mL	TE	TE	TE

* Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Tabloda "a" olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^3 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; "b" olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^5 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; "c" olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^7 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle aittir. Kullanılan kısaltmalar: TE, tespit edilemedi; SD, sayılamayacak düzeyde.

Belirlenen konsantrasyonda hazırlanmış olan *Lactobacillus acidophilus* LA-5, 320 μ m genlikte, 65 °C sıcaklıkta, 60 dakikalık ultrases işlemi ile işlenmiş ve mikrobiyal canlılık incelenmiştir (Ek A11). Buna göre, 1×10^{-12} g/mL konsantrasyonda kullanılan *Lactobacillus acidophilus* LA-5, 12×10^5 kob/mL düzeylerinde gelişmiş ve uygulanan ultrases işlemi sonucunda tam ölüm gerçekleşebilmiştir.

Alınan son önlemler ve değişikliklerle ultrases ile tam ölüm elde edilebilmenin sağlandığı görülmüş ve esas denemelere geçilmiştir. Çalışmadaki ultrases işleme ile postbiyotik eldesinde, ön deneme çalışmaları sonucunda kullanılmasına karar verilen deneme planı Tablo 3.2'de sunulmuştur.

Belirlenen deneme planı doğrultusunda, işlem koşulları karışık olarak denenmiştir ve toplam 5 farklı sette analizler gerçekleştirilmiştir. Her bir setteki başlangıç organizma sayılarını göstermek üzere ultrases işleme tabi tutulmayan kontrol örnekleri ile ultrases işlemeye tabi tutulan örneklerin petrilerinden alınan örnek görüntüler Ek A12-A16’da sunulmuştur. Sayım sonuçlarına göre *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak ultrases işleme ile çalışılan 16 işlem koşulunun 9’unda probiyotiklerin tamamen öldürüldüğü görülmüştür. MRS agarlara yapılmış ekim ve inkübasyon sonrası petrilerdeki sayım sonuçları ise Tablo 4.5’te verilmiştir.

Tablo 4.5 Belirli genliklerde ve sürelerde ultrases işlemi gören *Lactobacillus acidophilus* LA-5 mikroorganizmalarının ve kontrollerinin ekimden 48 saat sonraki sayım sonuçları.*

Genlik (µm)	İnkübasyon Süresi (dk)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 (kob/mL)
98	15	$35,9 \pm 5,5 \times 10^3$
	30	TE
	45	TE
	60	TE
172	15	$14,5 \pm 3,5 \times 10^2$
	30	TE
	45	TE
	60	TE
246	15	$5,5 \pm 2,1 \times 10^2$
	30	$18,8 \pm 1,9 \times 10^1$
	45	TE
	60	TE
320	15	$89,5 \pm 14,9 \times 10^2$
	30	$52,9 \pm 4,1 \times 10^2$
	45	$15,5 \pm 6,4 \times 10^2$
	60	TE

* Probiyotik sayım değerleri ultrases işleme sonrasında petrilerdeki sayım sonuçlarıdır ve ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Sayılabılır bir değer bulunmayan petrilerdeki sonuçlar “TE” olarak verilmiştir.

Lactobacillus acidophilus LA-5 suşunun çeşitli genlik ve inkübasyon sürelerinde ultrases işlemi sonrası canlılık durumu incelenmiştir. Tablo 4.5’te görüldüğü üzere, farklı genliklerde ve sürelerde yapılan ultrases işlemleri, *Lactobacillus acidophilus* LA-5’in canlılık oranlarını önemli ölçüde etkilemiştir.

Tablo 4.5'te görüldüğü üzere, genliğin azalması ve inkübasyon süresinin artışıyla birlikte *Lactobacillus acidophilus* LA-5 suşunun canlılık oranı önemli ölçüde azalmıştır. Özellikle, 98 µm genlikte 30 dakikalık inkübasyon süresi sonrasında ve daha uzun sürelerde canlı bakteri tespit edilememiştir. Benzer şekilde, 172 µm ve 246 µm genliklerde de 15 dakikadan sonra canlı bakteri sayısı tespit edilememiştir. En yüksek genlik olan 320 µm'de ise 45 dakikadan sonra canlı bakteri sayısı tespit edilememiştir.

Ultrases işleminin etkisi, genlik ve inkübasyon süresine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Düşük genliklerde (98 ve 172 µm), probiyotiklerin canlılık oranları hızlı bir şekilde azalırken, daha yüksek genliklerde (246 ve 320 µm) bu azalma daha yavaş gerçekleşmiştir. Özellikle 320 µm genlikte, 45 dakikaya kadar önemli bir canlılık oranı korunmuştur. Bu durum, daha yüksek genliklerde ultrases işleminin, probiyotiklerin yapısal bütünlüğünü koruyarak canlı kalabildiklerini göstermektedir.

Ultrases işleminin probiyotik bakteriler üzerindeki etkileri ile alakalı literatürde fazla çalışma bulunmamaktadır. Knorr ve diğerleri (2004), ultrases işleminin, özellikle yüksek genliklerde ve kısa süreli uygulamalarda, probiyotiklerin canlılık oranlarını koruyabileceğini göstermiştir. Bu bulgular, çalışmamızda elde edilen verilerle tutarlıdır (Knorr, Zenker, Heinz ve Lee, 2004).

Literatürdeki diğer çalışmalar da ultrases işlemine tabi tutulan *Lactobacillus acidophilus*'un canlılık oranlarının genlik ve süreye bağlı olarak azaldığını göstermektedir. Amaretti ve diğerleri (2013), ultrases işlemine tabi tutulan *Lactobacillus acidophilus* suşlarının antioksidan aktivitelerinin önemli ölçüde azaldığını ve genlik ile süre arttıkça canlılık oranının düştüğünü bildirmişlerdir. Bu çalışma, özellikle 172 µm genlikte 15 dakikalık inkübasyon süresi sonrasında canlı bakteri tespit edilememesiyle uyumludur.

Benzer şekilde, Birmpa ve diğerleri (2013), ultrases ile düşük sürelerde canlı kalan ancak 45 dakika ve üzerinde inaktive edilen *Staphylococcus aerus*'un hücre duvarlarının parçalanması ve DNA'sının hasara uğramasıyla inaktivasyona neden olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada, 320 µm genlikte 45 dakikalık inkübasyon süresi sonrasında canlı bakteri tespit edilememesi, hücre duvarı hasarının artan genlik ve süre ile doğrudan ilişkili olduğunu desteklemektedir.

Shin ve diğerkleri (2010), ultrases ile inaktive edilen *Lactobacillus acidophilus*'un fizyolojik salin solüsyonunda süspanse edildiğinde yüksek kolesterol seviyelerini azaltmada etkili olduğunu göstermiştir. Bu çalışma, özellikle düşük genliklerde (98 µm ve 172 µm) kısa sürelerde (15 dakika) canlı bakterilerin tespit edilebildiğini, ancak sürenin uzatılmasıyla birlikte canlılık oranının azaldığını göstermektedir.

Cuevas-González ve diğerkleri (2020), ultrases yöntemi ile inaktive edilen *Lactocaseibacillus casei* suşlarının hücre içi içerikleri ve hücre duvarı bileşenlerinin antioksidan, antienflamatuar ve immünomodülatör özellikler gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu bulgular, ultrases işlemine tabi tutulan *Lactobacillus acidophilus*'un genlik ve süreye bağlı olarak canlılık oranlarının azalmasıyla birlikte, hücre içi ve hücre duvarı bileşenlerinin sağlık yararlarını sürdürebileceğini göstermektedir.

Literatürdeki diğerk çalışmalarla uyumlu olarak, genlik ve süre arttıkça canlılık oranının azaldığı ve belirli genlik ve sürelerden sonra tamamen inaktive olduğu gözlemlenmiştir. Bu bulgular, ultrases işleminin probiyotiklerin inaktivasyonu için etkili bir yöntem olduğunu ve bu işlemin sağlık yararlarını sürdürmede potansiyel taşıdığını göstermektedir.

Isıl işlem, probiyotiklerin inaktivasyonunda oldukça etkili bir yöntem olup, düşük sıcaklıklarda bile kısa sürelerde tüm canlı hücreleri inaktive edebilmektedir. Bu bulgu, literatürdeki diğerk çalışmalarla uyumludur. Özellikle, Birmpa ve diğerkleri (2013), yüksek sıcaklıkların hücre duvarlarını parçalayıp hücre ölümüne neden olduğunu belirtmiştir. Amaretti ve diğerkleri (2013), ısıl işlemin probiyotiklerin antioksidan aktivitelerini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir.

Ultrases işleminde ise, genlik ve inkübasyon süresine bağlı olarak *Lactobacillus acidophilus* LA-5'in canlılık oranlarını farklı şekillerde etkilemektedir. Düşük genliklerde canlılık oranı hızla azalırken, yüksek genliklerde bu azalma daha yavaş gerçekleşmektedir. Özellikle 320 µm genlikte, probiyotikler 45 dakikaya kadar önemli ölçüde canlı kalabilmektedir. Bu bulgular, ultrases işleminin probiyotiklerin canlılığını korumada ve fonksiyonel özelliklerini sürdürmede etkili bir yöntem olabileceğini göstermektedir.

Hem ısıtma işlemi hem de ultrases yöntemi, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 suşunun inaktivasyonu için etkili yöntemlerdir. Isıtma işlemi, düşük sıcaklıklarda bile hızlı ve etkili bir inaktivasyon sağlarken, ultrases yöntemi genlik ve süreye bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Bu çalışma, her iki yöntemin de probiyotiklerin sağlık yararlarını koruyarak etkili inaktivasyon sağladığını göstermekte ve literatürdeki diğer çalışmalarla uyumlu sonuçlar sunmaktadır.

4.2. Postbiyotiklerin Probiyotik Geliştirici Aktiviteleri

4.2.1. *L. casei* 431'in ve *Bifidobacterium* kültürünün Aktifleştirilmesi

Lactobacillus casei 431 probiyotik organizması, $0,1 \times 10^{-10}$ g/mL düzeyinde seyreltmeyle üretilmiş ve üretimi sırasında ortama %1, %3, %5 ve %10 düzeylerinde postbiyotik ilave edilerek, probiyotik gelişimi/canlılığı üzerindeki etkileri bakteri sayımı ile saptanmıştır (Ek B1). Buna göre, ön denemedeki postbiyotik konsantrasyonunun probiyotik bakterinin gelişimi üzerine etkilerinin sayısal gösterimi Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6'daki sonuçlara göre, kontrol örneğindeki probiyotik miktarı ile %5'lik postbiyotik ilavesi sonrasında istatistiksel olarak anlamlı bir sayısal fark gerçekleşmektedir ($p < 0,05$). Bundan dolayı, probiyotik gelişimini arttırıcı aktivite analizlerinde postbiyotik ilavesinin %5 oranında uygulanmasına ön denemeler doğrultusunda karar verilmiştir.

Tablo 4.6 Farklı postbiyotik konsantrasyonlarının probiyotik gelişimini arttırıcı aktivitelere etkileri.*

		Probiyotik Sayısı (kob/mL, 10^4)	Artış Oranı (-)
Postbiyotik Oranı	Kontrol	$112,5 \pm 4,9^{ab}$	-
	%1	$115,0 \pm 19,8^{ab}$	0,02
	%3	$125,5 \pm 9,2^b$	0,12
	%5	$161,0 \pm 7,1^c$	0,43
	%10	$94,0 \pm 11,3^a$	-0,16

* Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Artış oranı kat olarak verilmiştir. Üst indis olarak kullanılan harfler (a-c) aynı ise, farklı postbiyotik ilave oranlarındaki örnekler arasında fark olmadığı anlaşılmaktadır ($p > 0,05$).

Bifidobacterium kültürü (CSL, Direct Bifi, İtalya) için de 10^5 - 10^6 kob/mL düzeylerinde canlılığın elde edileceği konsantrasyonun belirlenmesi için bir ön deneme seti çalışılmıştır (Ek B2). Buna göre, *Bifidobacterium* kültürü, $0,1 \times 10^{-4}$ g/mL düzeyinde yapılacak seyreltmelerle üretildiğinde, 10^5 - 10^6 kob/mL düzeylerinde canlılığın elde edilebileceği belirlenmiş (Tablo 4.7) ve tez çalışmasında bu konsantrasyonların kullanılmasına karar verilmiştir.

Tablo 4.7 *Bifidobacterium* Kültürünün istenen düzeyde (10^5 - 10^6 kob/mL) gelişmesi için gerekli seyreltmelerin saptanması.*

	Probiyotik Sayısı (kob/mL)		
	a	b	c
$0,1 \times 10^{-2}$ g/mL	SD	SD	$23,5 \pm 3,5$
$0,1 \times 10^{-4}$ g/mL	$590,5 \pm 26,2$	$13,0 \pm 2,8$	TE

* Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^3 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^5 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “c” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^7 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle aittir. Kullanılan kısaltmalar: TE, tespit edilemedi; SD, sayılamayacak düzeyde.

4.2.2. Isıl İşleme Maruz Kalmış Postbiyotiklerin Probiyotikler Üzerine Etkileri

4.2.2.1. *Lacticaseibacillus casei* 431’ye Yönelik Probiyotik Geliştirici Aktivite

Çalışma kapsamında probiyotik geliştirici aktivite analizleri için yapılan kontrol ekimleri Ek B3’te verilirken, postbiyotik kullanılarak yapılan analizler sonucunda elde edilen petri görüntüleri farklı ısı işlem sıcaklıklarında *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak üretilen postbiyotikler için ayrı ayrı tablolar halinde sunulmuştur. Buna göre, 65 °C ısı işlem sıcaklığında elde edilmiş postbiyotikler için Ek B4, 75 °C ısı işlem sıcaklığında elde edilmiş postbiyotikler için Ek B5, 85 °C ısı işlem sıcaklığında elde edilmiş postbiyotikler için Ek B6 ve 95 °C ısı işlem sıcaklığında elde edilmiş postbiyotikler için Ek B7 verilmiştir. Ayrıca, elde edilen probiyotik geliştirici aktivite analizlerinin sayısal sonuçları ve istatistiksel değerlendirmesi Tablo 4.8’de verilmiştir.

65 °C’de yapılan işlemler arasında, 45 dakika süresindeki probiyotik sayısının, 60 dakika süresindeki probiyotik sayısından anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$) (Tablo 4.8). Benzer şekilde, 90 dakika süresindeki probiyotik sayısı, 60 dakika süresindeki

probiyotik sayısından anlamlı derecede yüksektir ($p<0,05$). Ancak, 30 ve 60 dakikalık süreler arasında da anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). Aynı şekilde 30, 45 ve 90 dakikalık süreler arasında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). 65 °C'de yapılan işlemler arasında, 45 dakika süresindeki artış oranının, 60 dakika süresindeki artış oranından anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Ancak, 30, 60 ve 90 dakikalık sürelerin kendileri arasında ve ayrıca 30, 45 ve 90 dakikalık sürelerin kendileri arasında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$).

75 °C'de yapılan işlemler arasında, 45 dakika süresindeki probiyotik sayısının, 15 ve 30 dakika sürelerindeki probiyotik sayısından anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Ayrıca, 60 dakika süresindeki probiyotik sayısı, 15 ve 30 dakika sürelerindeki probiyotik sayısından da anlamlı derecede yüksektir ($p<0,05$). Ancak, 15 ve 30 dakikalık süreler arasında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$).

85 °C'de yapılan işlemler arasında, 10 dakika süresindeki probiyotik sayısının, 30 dakika süresindeki probiyotik sayısından anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Ancak, 15, 30 ve 45 dakikalık süreler arasında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). 85 °C'de yapılan işlemler arasında, hiçbir sürede anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0,05$).

95 °C'de yapılan işlemler arasında, 10 dakika süresindeki probiyotik sayısının, 5 dakika süresindeki probiyotik sayısından anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Ancak, 10, 15 ve 30 dakikalık süreler arasında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). 95 °C'de yapılan işlemler arasında, 10 dakika süresindeki artış oranının, 5 dakika süresindeki artış oranından anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Ayrıca, 15 dakika süresindeki artış oranı, 5 dakika süresindeki artış oranından da anlamlı derecede yüksektir ($p<0,05$).

Tablo 4.8 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak ısıt işlemle üretilen postbiyotiklerin *Lactocaseibacillus casei* 431 üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizlerinin sayısal sonuçları.*

Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Örnekler	Probiyotik Sayısı (kob/mL, 10 ⁵)	Artış Oranı (-)
		Kontrol	34,5 ± 7,8 ^a	-
65	30	1	377,0 ± 29,7 ^{ghi}	9,93 ± 0,86 ^{ghi,xy,D}
	45	2	406,0 ± 19,8 ⁱ	10,77 ± 0,57 ^{i,y,B}
	60	3	331,5 ± 29,0 ^{efg}	8,61 ± 0,84 ^{efg,x}
	90	4	390,0 ± 15,6 ^{hi}	10,30 ± 0,45 ^{hi,xy}
75	15	5	110,0 ± 15,6 ^b	2,19 ± 0,45 ^{a,x,A}
	30	6	135,5 ± 16,3 ^b	2,93 ± 0,47 ^{a,x,A}
	45	7	224,0 ± 28,3 ^c	5,49 ± 0,82 ^{b,y,A}
	60	8	260,0 ± 17,0 ^{cde}	6,54 ± 0,49 ^{bcd,y}
85	10	9	313,5 ± 43,1 ^{efg}	8,09 ± 1,25 ^{def,x}
	15	10	281,5 ± 20,5 ^{cdef}	7,16 ± 0,59 ^{bcd,x,B}
	30	11	234,0 ± 39,6 ^c	5,78 ± 1,15 ^{b,x,B}
	45	12	263,0 ± 21,2 ^{cde}	6,62 ± 0,61 ^{bcd,x,A}
95	5	13	247,5 ± 20,5 ^{cd}	6,17 ± 0,59 ^{bc,x}
	10	14	343,0 ± 26,9 ^{fgh}	8,94 ± 0,78 ^{fgh,y}
	15	15	323,5 ± 26,2 ^{efg}	8,38 ± 0,76 ^{efg,y,B}
	30	16	300,0 ± 17,0 ^{defg}	7,70 ± 0,49 ^{cdef,xy,C}

* Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Artış oranı kat olarak verilmiştir. Üst indis olarak kullanılan harfler (a-i) aynı ise örnekler arasında fark olmadığı; (x-y) aynı ise aynı sıcaklıktaki farklı işlem süreleri arasında fark olmadığı; (A-D) aynı ise aynı işlem sürelerinde farklı sıcaklıklar arasında fark olmadığı anlaşılmaktadır (p>0,05).

15 dakika süre ile yapılan işlemler arasında, 75 °C'de uygulanan işlem sonucunda elde edilen artış oranı, diğer tüm sıcaklıklardaki işlemlerden anlamlı derecede düşüktür (p<0,05). 85 °C'de 15 dakika süre ile yapılan işlemde elde edilen artış oranı, 95 °C ile karşılaştırıldığında anlamlı fark göstermemektedir (p>0,05), ancak 75 °C'deki işlemde anlamlı derecede yüksektir (p<0,05).

30 dakika süre ile yapılan işlemler arasında, 65 °C'de uygulanan işlem sonucunda elde edilen artış oranı, 75 °C, 85 °C ve 95 °C'de uygulanan işlem sonucunda elde edilen artış oranından anlamlı derecede yüksektir (p<0,05). 95 °C'de uygulanan işlem sonucunda elde edilen artış

oranı, 85 °C'deki işlemde anlamlı derecede yüksektir ($p<0,05$). 85 °C'de uygulanan işlem sonucunda elde edilen artış oranı, 75 °C'deki işlemde anlamlı derecede yüksektir ($p<0,05$).

45 dakika süre ile yapılan işlemler arasında, 65 °C'de uygulanan işlem sonucunda elde edilen artış oranı, diğer tüm sıcaklıklardaki işlemlerden anlamlı derecede yüksektir ($p<0,05$). 75 °C ve 85 °C'de uygulanan işlemler arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

En yüksek artış oranları genellikle 65 °C'de yapılan işlemlerden elde edilmiştir. Özellikle, 65 °C'de 45 dakika süresindeki işlem, diğer tüm sıcaklıklardaki işlemlerle karşılaştırıldığında en yüksek artış oranını göstermiştir. Bu bulgu, 65 °C'deki işlemin, probiyotik aktiviteyi en fazla artıran sıcaklık olduğunu göstermektedir. Ayrıca, 65 °C'de 60 ve 90 dakika süre ile yapılan işlemler de yüksek artış oranları göstermiştir. En düşük artış oranları ise genellikle 75 °C'de yapılan işlemlerden elde edilmiştir. 75 °C'de 15 dakika süresindeki işlem, diğer tüm sıcaklıklardaki işlemlerle karşılaştırıldığında en düşük artış oranını göstermiştir. Bu bulgu, 75 °C'deki işlemin, probiyotik aktiviteyi en az artıran sıcaklık olduğunu göstermektedir.

Literatürdeki çalışmalarla karşılaştırıldığında, bu sonuçlar ısıl işlemin probiyotiklerin hücre duvarlarını parçalayıp, hücrelerin içeriğindeki biyoaktif bileşiklerin serbest kalmasını sağladığını ve bu bileşiklerin diğer probiyotiklerin gelişimini teşvik ettiğini ortaya koymaktadır. Örneğin, Paéz ve diğerleri (2012), ısıl işlem görmüş probiyotiklerin, probiyotiklerin gastrointestinal sistemde daha iyi hayatta kalmasını ve fonksiyonlarını yerine getirmesini sağlayan biyoaktif bileşikler ürettiğini belirtmiştir (Paéz, Lavari, Vinderola, Audero, Cuatrin, Zaritzky ve Reinheimer, 2012).

Shah ve diğerleri (2000) ise, ısıl işlem uygulanan probiyotiklerin, diğer probiyotiklerin bağışıklık sistemini modüle edici etkilerini artırdığını göstermiştir. Bu çalışmalar, elde edilen verilerle uyumlu olup, ısıl işlemle üretilen postbiyotiklerin probiyotik geliştirici aktivitelerini desteklemektedir.

Isıl işlem, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak üretilen postbiyotiklerin, *Lactocaseibacillus casei* 431 suşu üzerindeki probiyotik geliştirici aktivitesini artırmada etkili bir yöntemdir. Farklı sıcaklık ve sürelerde elde edilen veriler, probiyotiklerin artış oranlarının belirgin şekilde arttığını göstermektedir. Literatürdeki çalışmalarla uyumlu olan bu sonuçlar,

ısıtılmanın probiyotiklerin sağlık üzerindeki olumlu etkilerini artırmada kullanılabileceğini göstermektedir.

4.2.2.2. *Bifidobacterium*’a Yönelik Probiyotik Geliştirici Aktivite

Isıl işlemle üretilmiş olan postbiyotiklerin *Bifidobacterium* kültürü üzerindeki geliştirici aktivitesi tayininde, hazırlanan petrilerin inkübasyonunda anaerobik jar kullanılmıştır. Tez kapsamında ısıtılma işlemle *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak üretilmiş 16 farklı postbiyotik vardır ve *Lactocaseibacillus casei* 431 üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizi için her bir ekimde 3 farklı seyreltme ile (10^{-3} , 10^{-5} ve 10^{-7}) paralelli olarak ekimler yapılmıştır. Ancak, *Bifidobacterium* kültürünün geliştirilebilmesi için Anaerocult A kullanarak anaerobik jarda inkübasyonun gerçekleştirilmesi zorunlu olduğundan ve elimizde 3 adet anaerobik jar olduğundan (ve bu jarlarda da en fazla 12 petri inkübe edilebildiğinden), bu deneme planı ile çok fazla sayıda sette ekimin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Her bir setin analizinin sonuçlanması yaklaşık 1 hafta sürdüğünden hem önemli bir zaman almakta, hem de her setteki kontrol ekimlerindeki farklılıklardan ötürü ciddi standart sapmalar gözlemlenmektedir. Tüm bu nedenlerle, *Bifidobacterium* kültürüne dair probiyotik geliştirici aktivite analizindeki ekim aşamasındaki seyreltmeler iki farklı düzeyde yapılmıştır (10^{-4} ve 10^{-6} düzeylerinde). Buna rağmen, kontrol gruplarında belirli sapmalarla probiyotik sayıları elde edilebildiğinden (10^5 ile 10^7 kob/mL aralığında), paralel setler arasında kob/mL cinsinden bakteri sayılarda önemli standart sapmalar ortaya çıkmış ve sonuçların bu şekilde verilmesi anlamlı bulunmamış, bunun yerine esas değerlendirme parametresi olan ve her bir ekimdeki kontrole oranla gerçekleşen artış oranları ortalama ve standart sapma olarak verilmiş, istatistikler de bu artış oranları üzerinden yapılmıştır.

Tez çalışmasında probiyotik geliştirici aktivite analizleri sonucunda elde edilen petri görüntüleri farklı ısıtılma işlem sıcaklıklarında üretilen postbiyotikler için ayrı ayrı tablolarda sunulmuştur. Çalışma kapsamında probiyotik geliştirici aktivite analizleri için yapılan kontrol ekimleri Ek B8’de, 65 °C ısıtılma işlem sıcaklığında elde edilmiş postbiyotikler için petri görüntüleri Ek B9’da, 75 °C ısıtılma işlem sıcaklığında elde edilmiş postbiyotikler için petri görüntüleri Ek B10’da, 85 °C ısıtılma işlem sıcaklığında elde edilmiş postbiyotikler için petri görüntüleri Ek B11’de ve 95 °C ısıtılma işlem sıcaklığında elde edilmiş postbiyotikler için petri

görüntüleri Ek B12'de verilmiştir. Ayrıca, elde edilen probiyotik geliştirici aktivite analizlerinin sayısal sonuçları ve istatistiksel değerlendirmesi Tablo 4.9'da verilmiştir.

65 °C'de yapılan işlemler arasında, 30, 45, 60 ve 90 dakikalık sürelerde anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). Tüm bu sürelerde artış oranları benzer düzeydedir ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

75 °C'de yapılan işlemler arasında da, 15, 30, 45 ve 60 dakikalık sürelerde anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). Bu sürelerde de artış oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

85 °C'de yapılan işlemler arasında, 10, 15 ve 45 dakikalık sürelerde anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). Ancak, 30 dakika süresindeki artış oranı, diğer sürelerdeki artış oranlarından anlamlı derecede yüksektir ($p<0,05$).

95 °C'de yapılan işlemler arasında, 10, 15 ve 30 dakikalık sürelerde anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). Ancak, 5 dakika süresindeki artış oranı, diğer sürelerdeki artış oranlarından anlamlı derecede yüksektir ($p<0,05$).

Aynı sürelerde farklı sıcaklıklar karşılaştırıldığında, 30 dakika süresinde 65 °C ve 75 °C arasında anlamlı fark bulunmaktadır. 85 °C'deki artış oranı, 65 °C ve 75 °C'deki artış oranlarından anlamlı derecede yüksektir ve 95 °C'deki artış oranı 65 °C'deki artış oranından anlamlı derecede yüksek, 75 °C ve 85 °C'deki artış oranlarından anlamlı derecede düşüktür ($p<0,05$). 45 dakika süresinde 65 °C, 75 °C ve 85 °C arasında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). 60 dakika süresinde 65 °C ve 75 °C arasında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$).

Tablo 4.9 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak ısıtıl işlemle üretilen postbiyotiklerin *Bifidobacterium* kültürü üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizlerinin sayısal sonuçları.*

Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Örnekler	Artış Oranı (-)
65	30	1	0,13 ± 0,17 ^{a,x,A}
	45	2	0,74 ± 0,33 ^{ab,x,A}
	60	3	0,84 ± 0,32 ^{ab,x}
	90	4	0,76 ± 0,37 ^{ab,x}
75	15	5	0,93 ± 0,25 ^{ab,x,A}
	30	6	1,24 ± 0,68 ^{b,x,A}
	45	7	1,00 ± 0,44 ^{ab,x,A}
	60	8	1,22 ± 0,32 ^{b,x}
85	10	9	0,97 ± 0,43 ^{ab,x}
	15	10	0,57 ± 0,25 ^{ab,x,A}
	30	11	3,52 ± 0,73 ^{d,y,B}
	45	12	0,24 ± 0,22 ^{a,x,A}
95	5	13	2,21 ± 0,25 ^{c,y}
	10	14	0,67 ± 0,27 ^{ab,x}
	15	15	0,91 ± 0,19 ^{ab,x,A}
	30	16	0,94 ± 0,40 ^{ab,x,A}

* Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Artış oranı kat olarak verilmiştir. Üst indis olarak kullanılan harfler (a-d) aynı ise örnekler arasında fark olmadığı; (x-y) aynı ise aynı sıcaklıktaki farklı işlem süreleri arasında fark olmadığı; (A-B) aynı ise aynı işlem sürelerinde farklı sıcaklıklar arasında fark olmadığı anlaşılmalıdır (p>0,05).

Farklı sıcaklık ve sürelerde uygulanan ısıtıl işlemler, *Bifidobacterium* kültürü üzerindeki artış oranı üzerinde önemli ölçüde etkili olmuştur. 65 °C ve 75 °C'de yapılan işlemler arasında anlamlı farklar tespit edilmemiştir (p>0,05). 85 °C'de 30 dakika süresindeki artış oranı, diğer sürelerden anlamlı derecede yüksektir (p<0,05). 95 °C'de 5 dakika süresindeki artış oranı, diğer sürelerden anlamlı derecede yüksektir (p<0,05). Aynı sürelerde farklı sıcaklıklar karşılaştırıldığında, 30 dakika süresinde 85 °C'deki artış oranı, diğer sıcaklıklardan anlamlı derecede yüksektir (p<0,05).

Sonuç olarak, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak ısıtıl işlemle üretilen postbiyotiklerin *Bifidobacterium* kültürü üzerindeki etkinliği, sıcaklık ve süreye bağlı olarak değişim göstermektedir. Özellikle 85 °C'de 30 dakika ve 95 °C'de 5 dakika sürelerinde daha yüksek artış oranları gözlemlenmiştir.

Literatürdeki çalışmalarla karşılaştırıldığında, bu sonuçlar ısıtıl işlemin probiyotiklerin hücre duvarlarını parçalayıp, hücrelerin içeriğindeki biyoaktif bileşiklerin serbest kalmasını sağladığını ve bu bileşiklerin diğer probiyotiklerin gelişimini teşvik ettiğini ortaya koymaktadır. Örneğin, Paéz ve diğerleri (2012), ısıtıl işlem görmüş probiyotiklerin, probiyotiklerin gastrointestinal sistemde daha iyi hayatta kalmasını ve fonksiyonlarını yerine getirmesini sağlayan biyoaktif bileşikler ürettiğini belirtmiştir.

Shah ve diğerleri (2000) ise, ısıtıl işlem uygulanan probiyotiklerin, diğer probiyotiklerin bağışıklık sistemini modüle edici etkilerini artırdığını göstermiştir. Bu çalışmalar, elde edilen verilerle uyumlu olup, ısıtıl işlemle üretilen postbiyotiklerin probiyotik geliştirici aktivitelerini desteklemektedir.

Isıtıl işlemin probiyotik geliştirme üzerindeki etkisi, sıcaklık ve süreye bağlı olarak önemli ölçüde değişkenlik göstermektedir. 75 °C ve 95 °C'de yapılan işlemler, özellikle belirli sürelerde, yüksek probiyotik geliştirme aktivitesi göstermektedir.

Literatürde, ısıtıl işlemin probiyotiklerin aktivitesi üzerindeki etkisi geniş bir şekilde araştırılmıştır. Örneğin, Chen ve diğerleri (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, ısıtıl işlemin belirli probiyotik suşlarının metabolik aktivitelerini artırabileceği bildirilmiştir (Chen, Chen, Liu, Lin, ve Chiu, 2005a).

Özellikle 85 °C ve 95 °C'de yapılan işlemlerde, belirli sürelerde (30 dakika ve 5 dakika) elde edilen yüksek artış oranları, bu sıcaklık ve süre kombinasyonlarının probiyotik geliştirici aktiviteyi en üst düzeye çıkarabileceğini göstermektedir. Bu bulgular, çalışmamızda elde edilen verilerle uyumludur.

Isıtıl işlem, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak üretilen postbiyotiklerin, *Bifidobacterium* kültürü üzerindeki probiyotik geliştirici aktivitesini artırmada etkili bir yöntemdir. Farklı sıcaklık ve sürelerde elde edilen veriler, probiyotiklerin artış oranlarının

belirgin şekilde arttığını göstermektedir. Literatürdeki çalışmalarla uyumlu olan bu sonuçlar, ısıtıl işlemin probiyotiklerin sağlık üzerindeki olumlu etkilerini artırmada kullanılabileceğini göstermektedir.

Tablo 4.8’de sunulan veriler, ısıtıl işlemin *Lactocaseibacillus casei* 431 üzerindeki probiyotik geliştirici aktivitesini önemli ölçüde artırdığını göstermektedir. Kontrol örneği ile karşılaştırıldığında, 65 °C’de 30 dakika süreyle uygulanan ısıtıl işlemde probiyotik sayısında yaklaşık 10 katlık bir artış gözlenmiştir ($9,93 \pm 0,86$). Benzer şekilde, 75 °C’de 45 dakika süreyle uygulanan ısıtıl işlemde probiyotik sayısındaki artış oranı $5,49 \pm 0,82$ olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, ısıtıl işlemin, özellikle düşük sıcaklıklarda ve uzun sürelerde, probiyotiklerin büyümesini teşvik ettiğini göstermektedir.

Tablo 4.9’da sunulan veriler, ısıtıl işlemin *Bifidobacterium* kültürü üzerindeki etkilerini göstermektedir. Bu tablodan elde edilen bulgular, 65 °C’de 30 dakika süreyle uygulanan ısıtıl işlemin *Bifidobacterium* kültürü üzerindeki probiyotik geliştirici aktivitesini minimal düzeyde artırdığını göstermektedir ($0,13 \pm 0,17$). Ancak, 85 °C’de 30 dakika süreyle uygulanan ısıtıl işlemde bu artış oranı $3,52 \pm 0,73$ ’e ulaşarak maksimum seviyeye çıkmıştır. Bu durum, belirli sıcaklık ve süre kombinasyonlarının *Bifidobacterium* kültürü üzerindeki probiyotik geliştirici etkilerini optimize edebileceğini göstermektedir.

Isıtıl işlemin her iki kültür üzerindeki etkilerini karşılaştırdığımızda, *Lactocaseibacillus casei* 431’in, düşük sıcaklıklarda bile probiyotik sayısında önemli artışlar gösterdiği, buna karşın *Bifidobacterium* kültürünün daha yüksek sıcaklıklarda ve belirli sürelerde (özellikle 85 °C’de 30 dakika) daha yüksek artış oranları sergilediği görülmektedir. Bu farklılık, her iki probiyotik suşunun farklı termal tolerans ve metabolik tepkilerine işaret etmektedir.

Literatürde, ısıtıl işlem uygulanan probiyotiklerin bağışıklık sistemini modüle edici etkileri artırdığı belirtilmiştir (Shah ve diğerleri, 2000). Ayrıca, Paéz ve diğerleri (2012), ısıtıl işlem görmüş probiyotiklerin gastrointestinal sistemde daha iyi hayatta kalmasını ve fonksiyonlarını yerine getirmesini sağlayan biyoaktif bileşikler ürettiğini belirtmiştir. Bu çalışmalar, elde edilen verilerle uyumlu olup, ısıtıl işlemle üretilen postbiyotiklerin probiyotik geliştirici aktivitelerini desteklemektedir.

Isıl işlem, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak üretilen postbiyotiklerin, *Lactocaseibacillus casei* 431 ve *Bifidobacterium* kültürleri üzerindeki probiyotik geliştirici aktivitelerini artırmada etkili bir yöntemdir. *Lactocaseibacillus casei* 431, daha düşük sıcaklıklarda bile önemli artışlar gösterirken, *Bifidobacterium* kültürü, daha yüksek sıcaklıklarda ve belirli sürelerde maksimum artış oranlarına ulaşmaktadır. Bu bulgular, her iki probiyotik suşunun termal toleranslarının ve metabolik tepkilerinin farklı olduğunu göstermekte olup, ısıtma işlemiyle üretilen postbiyotiklerin sağlık üzerindeki olumlu etkilerini optimize etmek için farklı parametrelerin dikkate alınması gerektiğini ortaya koymaktadır.

4.2.3. Ultrasese Maruz Kalmış Postbiyotiklerin Probiyotikler Üzerine Etkileri

4.2.3.1. *Lactocaseibacillus casei* 431'ye Yönelik Probiyotik Geliştirici Aktivite

Tablo 4.10'da, ultrases uygulamasının süre (dakika) ve genlik (μm) parametrelerine göre *Lactocaseibacillus casei* 431 üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Kontrol grubunda herhangi bir ultrases işlemi uygulanmamış olup, bu grup referans değeri olarak kullanılmıştır. Bu grupta herhangi bir artış gözlemlenmemiştir ve bu değeri artış oranı için sıfır olarak belirlenmiştir.

98 μm genlikte, 30 dakikalık süre ile 45 ve 60 dakikalık süreler arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). Bu genlikte tüm sürelerde negatif artış oranları gözlemlenmiştir. 30 dakika uygulanan ultrases sonucu ile 45 ve 60 dakikalık işlemler arasında anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$), ancak 60 dakikalık süredeki artış oranı diğer sürelerden daha yüksektir ve bu fark anlamlı değildir ($p>0,05$).

172 μm genlikte, 30, 45 ve 60 dakikalık işlemler arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). 30 dakika uygulanan ultrases sonucu ile 45 ve 60 dakikalık işlemler arasında anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$). Ancak, 60 dakika süresinin diğer sürelerden daha yüksek bir artış oranı sağladığı gözlemlenmiştir ve bu fark anlamlıdır ($p<0,05$).

Tablo 4.10 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak ultrases ile üretilen postbiyotiklerin *Lactocaseibacillus casei* 431 üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizlerinin sayısal sonuçları.*

Genlik (µm)	Süre (dk)	Örnek	Artış Oranı (-)
-	-	Kontrol	-
98	30	2	-0,15 ± 0,11 ^{a,x}
	45	3	-0,20 ± 0,26 ^{a,x,A}
	60	4	-0,14 ± 0,26 ^{a,x,A}
172	30	6	-0,02 ± 0,13 ^{ab,xy}
	45	7	-0,03 ± 0,11 ^{ab,y,A}
	60	8	0,40 ± 0,15 ^{b,y,A}
246	45	11	-0,25 ± 0,11 ^{a,A}
	60	12	0,38 ± 0,35 ^{b,A}
320	60	16	0,20 ± 0,22 ^{ab,A}

* Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Artış oranı kat olarak verilmiştir. Üst indis olarak kullanılan harfler (a-d) aynı ise farklı örnekler arasında fark olmadığı, (x-y) aynı ise aynı genlikteki farklı işlem süreleri arasında fark olmadığı, (A-B) aynı ise aynı işlem sürelerinde farklı genlikler arasında fark olmadığı anlaşılmalıdır (p>0,05).

246 µm genlikte, 45 ve 60 dakikalık işlemler arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır (p>0,05). 45 dakika uygulanan ultrases sonucu ile 60 dakikalık işlem süresinde belirgin şekilde daha yüksek bir artış oranı sağlanmıştır, ancak bu süreler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (p>0,05).

320 µm genlikte sadece 60 dakikalık işlem süresi uygulanmış olup, bu süre içinde gözlemlenen artış oranı diğer genlik ve süreler ile kıyaslandığında 98 µm ve 246 µm genliklerdeki 60 dakika süreler ile benzer olup, anlamlı bir fark göstermemektedir (p>0,05).

Genel olarak, genlik ve süreler arttıkça artış oranlarında bir artış gözlemlenmiştir. Ancak, her genlik ve süre kombinasyonu arasında anlamlı farklar bulunmamaktadır. 98 µm genlikte 30 dakika süre ile 60 dakika süre arasında anlamlı fark bulunmamıştır (p>0,05). 172 µm genlikte ise 45 dakika ve 60 dakika süreler arasında anlamlı farklar bulunmuştur (p<0,05).

Aynı süre farklı genliklerdeki örnekler de kıyaslandığında, 30 dakika sürede, 98 µm genlik en düşük değeri gösterirken, 172 µm genlik daha yüksek bir değer göstermiştir. Bu süre içerisinde farklı genlikler arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır (p>0,05). 45 dakika sürede, 98 µm genlik negatif bir artış oranı gösterirken, 172 µm genlik daha yüksek artış oranları göstermiştir. Bu genlikler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (p>0,05). 60 dakika sürede, 98 µm genlik negatif bir artış oranı gösterirken, 172 µm genlik ve

246 µm genlik daha yüksek artış oranları göstermiştir. 246 µm genlikteki artış oranı, diğer iki genlikteki değerlerden anlamlı derecede farklı değildir ($p>0,05$). 320 µm genlikte ise artış oranı diğer genliklerle anlamlı bir fark göstermemektedir ($p>0,05$).

Bu çalışmada elde edilen bulgular, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak ultrases ile üretilen postbiyotiklerin, *Lactocaseibacillus casei* 431 üzerindeki probiyotik geliştirici aktivitesini artırma potansiyelini ortaya koymaktadır. Tablo 4.10'daki sonuçlar, farklı genlik ve sürelerde uygulanan ultrases işlemlerinin probiyotik artış oranları üzerindeki etkilerini göstermektedir. Bu bulgular, literatürdeki çalışmalarla karşılaştırılarak değerlendirildiğinde daha kapsamlı bir anlayış elde edilebilir.

Lactiplantibacillus plantarum ve *Saccharomyces cerevisiae* kullanılarak yapılan çalışmalarda, ultrases işleminin probiyotik canlılığını artırmada etkili olduğunu göstermektedir. Özellikle, ultrasesin *S. cerevisiae* hücre duvarında çatlak ve delikler oluşturduğu ve bunun da *L. plantarum*'un canlılığını artırdığı belirtilmiştir (Lieu, Tran, Nguyen ve Dang, 2023). Bu yöntem, probiyotiklerin stabilitesini artırmak ve depolama süresi boyunca canlılıklarını korumak amacıyla kullanılmıştır.

Tablo 4.10'da sunulan sonuçlar ile karşılaştırıldığında, ultrases genlik ve süresinin probiyotik aktivite üzerindeki etkisinin belirgin olduğu görülmektedir. 172 µm genlikte ve 60 dakika süreyle uygulanan ultrases işlemi, $0,40 \pm 0,15$ artış oranı ile en yüksek probiyotik artışı sağlamıştır. Benzer şekilde, 246 µm genlikte ve 60 dakika süreyle uygulanan işlem de $0,38 \pm 0,35$ artış oranı ile dikkate değer bir sonuç vermiştir. Bu bulgular, makaledeki ultrases işlemlerinin probiyotik canlılığı üzerindeki olumlu etkileri ile uyumludur (Lieu ve diğerleri, 2023).

Ancak, daha düşük genliklerde (98 µm) ve daha kısa sürelerde yapılan işlemler, probiyotik artış oranlarında negatif sonuçlar vermiştir. Örneğin, 98 µm genlikte ve 45 dakika süreyle uygulanan işlemde artış oranı $-0,20 \pm 0,26$ olarak belirlenmiştir. Bu durum, düşük genlik ve sürelerin probiyotik mikroorganizmalar üzerinde olumsuz etkileri olabileceğini göstermektedir. Makaledeki bulgularla karşılaştırıldığında, düşük genlik ve kısa sürelerin probiyotik stabilitesi ve canlılığı üzerinde negatif etkileri olduğu sonucuna varılabilir (Lieu ve diğerleri, 2023).

Sonuç olarak, bu çalışma, ultrasesla üretilen postbiyotiklerin probiyotik aktiviteyi geliştirme potansiyelini ortaya koymaktadır. Elde edilen bulgular, ultrases ile üretilen postbiyotiklerin *Lactocaseibacillus casei* 431 üzerindeki probiyotik geliştirici aktivitesinin genlik ve süreye bağlı olarak değiştiğini göstermektedir. Literatürdeki diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında, bu çalışmanın sonuçları genel olarak uyumlu ve destekleyicidir. Bu bulgular, ultrases teknolojisinin postbiyotik üretiminde etkin bir yöntem olduğunu ve probiyotik geliştirici aktivitelerin optimize edilebileceğini göstermektedir.

4.2.3.2. *Bifidobacterium*’a Yönelik Probiyotik Geliştirici Aktivite

Tablo 4.11, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak ultrases ile üretilen postbiyotiklerin *Bifidobacterium* kültürü üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizlerinin sayısal sonuçlarını göstermektedir.

98 µm genlikte, 30 dakikalık süre ile 45 ve 60 dakikalık süreler arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). Bu genlikte, tüm sürelerde negatif veya düşük pozitif artış oranları gözlemlenmiştir. 30 dakika uygulanan ultrases sonucu ile 45 ve 60 dakikalık işlemler arasında anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$), ancak 60 dakikalık süredeki artış oranı diğer sürelerden daha yüksektir ve bu fark anlamlı değildir ($p>0,05$).

172 µm genlikte, 30, 45 ve 60 dakikalık işlemler arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). 30 dakika uygulanan ultrases sonucu ile 45 ve 60 dakikalık işlemler arasında anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$). Ancak, 45 dakika süresinin diğer sürelerden daha yüksek bir artış oranı sağladığı gözlemlenmiştir ve bu fark anlamlıdır ($p<0,05$).

246 µm genlikte, 45 ve 60 dakikalık işlemler arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). 45 dakika uygulanan ultrases sonucu ile 60 dakikalık işlem süresinde belirgin şekilde daha yüksek bir artış oranı sağlanmıştır, ancak bu süreler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

Tablo 4.11 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak ultrases ile üretilen postbiyotiklerin *Bifidobacterium* kültürü üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizlerinin sayısal sonuçları.*

Genlik (µm)	Süre (dk)	Örnek	Artış Oranı (-)
-	-	Kontrol	-
98	30	2	-0,23 ± 0,13 ^{ab,x}
	45	3	-0,14 ± 0,16 ^{abc,x,A}
	60	4	0,31 ± 0,20 ^{cd,x,B}
172	30	6	-0,24 ± 0,08 ^{ab,x}
	45	7	0,50 ± 0,35 ^{d,x,A}
	60	8	0,15 ± 0,20 ^{bcd,x,B}
246	45	11	-0,14 ± 0,16 ^{abc,A}
	60	12	-0,05 ± 0,14 ^{abc,AB}
320	60	16	-0,51 ± 0,08 ^{a,A}

* Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Artış oranı kat olarak verilmiştir. Üst indis olarak kullanılan harfler (a-d) aynı ise farklı örnekler arasında fark olmadığı, (x-y) aynı ise aynı genlikteki farklı işlem süreleri arasında fark olmadığı, (A-B) aynı ise aynı işlem sürelerinde farklı genlikler arasında fark olmadığı anlaşılmalıdır (p>0,05).

320 µm genlikte sadece 60 dakikalık işlem süresi uygulanmış olup, bu süre içinde gözlemlenen artış oranı diğer genlik ve süreler ile kıyaslandığında 98 µm ve 246 µm genliklerdeki 60 dakika süreler ile benzer olup, anlamlı bir fark göstermemektedir (p>0,05).

Genel olarak, genlik ve süreler arttıkça artış oranlarında bir artış gözlemlenmiştir. Ancak, her genlik ve süre kombinasyonu arasında anlamlı farklar bulunmamaktadır. 98 µm genlikte 30 dakika süre ile 60 dakika süre arasında anlamlı fark bulunmamıştır (p>0,05). 172 µm genlikte ise 45 dakika ve 60 dakika süreler arasında anlamlı farklar bulunmuştur (p<0,05).

Aynı süre farklı genliklerdeki örnekler de kıyaslandığında, 30 dakika sürede, 98 µm genlik en düşük değeri gösterirken, 172 µm genlik daha yüksek bir değer göstermiştir. Bu süre içerisinde farklı genlikler arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır (p>0,05). 45 dakika sürede, 98 µm genlik negatif bir artış oranı gösterirken, 172 µm genlik daha yüksek artış oranları göstermiştir. Bu genlikler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (p>0,05). 60 dakika sürede, 98 µm genlik negatif bir artış oranı gösterirken, 172 µm genlik ve 246 µm genlik daha yüksek artış oranları göstermiştir. 246 µm genlikteki artış oranı, diğer iki genlikteki değerlerden anlamlı derecede farklı değildir (p>0,05). 320 µm genlikte ise artış oranı diğer genliklerle anlamlı bir fark göstermemektedir (p>0,05).

Sonuç olarak, farklı genlik ve sürelerde uygulanan ultrases işlemlerinin *Bifidobacterium* kültürü üzerindeki probiyotik geliştirici aktivitesi üzerindeki etkisi önemli ölçüde değişkenlik göstermektedir. Daha yüksek genliklerde ve kısa sürelerde yapılan işlemler genellikle daha düşük veya negatif artış oranları göstermiştir. Bununla birlikte, belirli genlik ve süre kombinasyonları pozitif sonuçlar verebilmiştir.

Literatürdeki benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında, ultrases uygulamalarının probiyotik mikroorganizmalar üzerinde değişken etkiler gösterebildiği anlaşılmaktadır. Gao ve diğerleri (2014), ultrases uygulamalarının bakteriyel hücre duvarında hasara yol açarak canlılığını azalttığını belirtmiştir. Bu çalışmalar, mevcut verilerle uyumlu sonuçlar sunmaktadır ve ultrases uygulamalarının probiyotik kültürler üzerindeki etkilerini vurgulamaktadır (Gao, Lewis, Ashokkumar ve Hemar, 2014).

Kavita ve diğerleri (2024) çalışmasında, kısa zincirli yağ asitleri (KZYA'lar) gibi postbiyotiklerin bağırsak sağlığını korumada ve probiyotik aktiviteleri artırmada önemli rol oynadığını belirtmektedirler (Kavita, Om, Chand, & Kushawaha, 2024).

Sonuç olarak, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak ultrases ile üretilen postbiyotiklerin *Bifidobacterium* kültürü üzerindeki probiyotik geliştirici aktivitesi, genlik ve süre parametrelerine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Daha düşük genlik ve sürelerde probiyotik sayısında belirgin azalmalar gözlenirken, bazı durumlarda daha yüksek genlik ve sürelerde probiyotik sayısında artışlar gözlenmiştir. Bu bulgular, ultrases parametrelerinin optimizasyonunun önemini vurgulamakta ve literatürdeki benzer çalışmalarla uyumlu sonuçlar sunmaktadır.

Lactobacillus acidophilus LA-5 kullanılarak ultrases ile üretilen postbiyotiklerin *Lactocaseibacillus casei* 431 ve *Bifidobacterium* kültürü üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizleri, her iki tabloyu kıyaslayarak incelendiğinde farklı etkiler gözlemlenmiştir. Tablo 4.10, *Lactocaseibacillus casei* 431 üzerindeki etkileri gösterirken, Tablo 4.11 *Bifidobacterium* kültürü üzerindeki etkileri sunmaktadır. Bu iki tabloyu karşılaştırarak, farklı işlem yöntemlerinin ve mikroorganizma türlerinin postbiyotiklerin probiyotik geliştirici aktiviteleri üzerindeki etkileri değerlendirilebilir. Ultrases ile üretilen postbiyotiklerin, genellikle probiyotik sayısını azalttığı görülmektedir. Özellikle 60 dakika ve 98 µm genlikte,

Lacticaseibacillus casei 431 sayısında bir azalma gözlenmiştir. Buna karşılık, ısıl işleme üretilen postbiyotikler, *Bifidobacterium* kültüründe bazı koşullarda (özellikle 60 dakika ve 98 µm genlikte) probiyotik sayısını artırabilmektedir.

Her iki tabloyu karşılaştırdığımızda, ultrases uygulamasının *Lacticaseibacillus casei* 431 ve *Bifidobacterium* kültürü üzerinde farklı etkiler yarattığı görülmektedir. *Lacticaseibacillus casei* 431 kültüründe genellikle bir azalma gözlenirken, *Bifidobacterium* kültüründe hem azalma hem de artış gözlenmiştir. Bu farklılıklar, her iki mikroorganizmanın ultrases uygulamasına farklı tepkiler verdiğini göstermektedir.

Literatürdeki benzer çalışmalar da bu sonuçları desteklemektedir. Gao ve diğerleri (2014), ultrases uygulamalarının bakteriyel hücre duvarında hasara yol açarak canlılığı azalttığını belirtmiştir. Ancak, bazı çalışmalarda ultrases uygulamasının probiyotik aktiviteyi artırabileceği de bildirilmiştir (Valero, Recrosio, Saura, Muñoz, Martí, ve Lizama, 2007). Bu çalışmalar, mevcut verilerle uyumlu sonuçlar sunmakta ve ultrases uygulamalarının probiyotik kültürler üzerindeki etkilerini vurgulamaktadır.

Isıl işlem ve ultrases yöntemlerinin probiyotik geliştirici aktiviteleri karşılaştırıldığında, her iki yöntemin de farklı etkiler yarattığı görülmektedir. Isıl işlem genel olarak probiyotik sayısında daha fazla artışa neden olurken, ultrases uygulaması bazı durumlarda probiyotik sayısında azalma gözlenmesine neden olmuştur. Isıl işleme üretilen postbiyotikler, özellikle yüksek sıcaklık ve uzun sürelerde uygulandığında probiyotik sayısında belirgin bir artış sağlamaktadır. Buna karşılık, ultrases uygulamasında genlik ve süre arttıkça *Lacticaseibacillus casei* 431 üzerindeki probiyotik sayısında azalma gözlenmiştir.

Bifidobacterium kültürü üzerinde ise her iki yöntemin de farklı etkileri olduğu görülmektedir. Isıl işleme üretilen postbiyotikler, genel olarak probiyotik sayısında artış sağlamıştır. Ultrases uygulamasında ise genlik ve süre parametrelerine bağlı olarak probiyotik sayısında hem azalma hem de artış gözlenmiştir.

Sonuç olarak, her iki yöntem de probiyotik geliştirici aktiviteyi artırmak için etkili olabilir, ancak spesifik parametrelerin optimizasyonu ve mikroorganizma türüne göre uyarlanması gerekmektedir. Isıl işlem, özellikle yüksek sıcaklık ve uzun sürelerde daha etkili sonuçlar

verirken, ultrases uygulaması belirli koşullar altında probiyotik aktiviteyi artırabilir. Literatürdeki benzer çalışmalar da bu sonuçları desteklemektedir. Isıl işlem ve ultrases yöntemlerinin probiyotik kültürler üzerindeki etkileri, bu yöntemlerin doğru parametrelerle uygulanması halinde probiyotik geliştirme potansiyelini artırabileceğini göstermektedir (Gao ve diğerleri, 2014; Valero ve diğerleri, 2007).

4.3. Postbiyotiklerde Kısa Zincirli Yağ Asidi

4.3.1. Isıl İşleme Üretilmiş Postbiyotiklerin *L. casei* Ortamındaki KZYA Etkileri

Bu kapsamda asetik, propiyonik, bütirik, izobütirik, valerik, izovalerik ve hegzanoik kısa zincirli yağ asitleri belirlenmiştir.

Kontrol grubunda asetik asit konsantrasyonu $5847,7 \pm 216,8$ ng/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 4.12). Isıl işlem uygulamaları sonucunda, 65°C'de 90 dakika ($p<0,05$) ve 75°C'de 30 dakika ($p<0,05$) süreyle işlem gören örneklerde asetik asit konsantrasyonlarının anlamlı derecede arttığı görülmüştür. 30 dakikada 65 °C'de yapılan işlemin diğer sıcaklıklarda yapılan işlemin oranlarından anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu bulgular, farklı ısıl işlem koşullarının asetik asit üretimini etkilediğini göstermektedir.

Kontrol grubunda propiyonik asit konsantrasyonu $20,4 \pm 0,3$ ng/mL olarak ölçülmüştür (Tablo 4.12). Isıl işlem süreleri ve sıcaklıkları arttıkça propiyonik asit konsantrasyonlarında anlamlı artışlar kaydedilmiştir. 95 °C'de 10 dakika süre ile yapılan işlemde elde edilen oranın diğer sürelerle göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$). 30 dakika süre ile 75 °C süre ile yapılan işlemin oranının aynı sürede diğer sıcaklıklarda yapılan işlemlerin oranlarına göre anlamlı bir şekilde yüksek olduğu ($p<0,05$) ancak 15 ve 45 dakika süre ile yapılan işlemlerin farklı sıcaklıklarda elde edilen oranları arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Bu artışlar, ısıl işlemin propiyonik asit üretimi üzerinde önemli bir etkisi olduğunu ortaya koymaktadır.

Kontrol grubunda izobütirik asit konsantrasyonu $15,8 \pm 0,5$ ng/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 4.12). Isıl işlem süresi ve sıcaklığın artmasıyla izobütirik asit konsantrasyonlarında önemli artışlar gözlenmiştir. Özellikle 95 °C'de 15 dakika ($p<0,05$) süreyle işlem gören örneklerde izobütirik asit konsantrasyonlarının en yüksek değerlere ulaştığı görülmüştür. 75

°C’de 60 dakika yapılan işlemin 15 ve 30 dakika süre ile işlem gören örneklerle göre oranında anlamlı bir artış görülmüştür ($p<0,05$). Aynı zamanda 85 °C’de 10 dakika süre ile yapılan işlemin 30 ve 45 dakika sürelerdekine anlamlı bir şekilde yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

15 dakika süre ile 85 °C ve 95 °C’de yapılan işlemlerden elde edilen oranların 75 °C’de elde edilenden anlamlı derecede yüksek oldukları ($p<0,05$), 30 dakika süre ile 65 °C’de elde edilen sonuçların 85 °C ve 95 °C’de elde edilenlerden anlamlı derecede yüksek olduğu ($p<0,05$) ancak 45 dakikada yapılan işlemlerin farklı sıcaklıklarındaki oranlarda anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Bu sonuçlar, ısıl işlemin izobütirik asit üretimini de önemli derecede etkilediğini göstermektedir.

Kontrol grubunda bütirik asit konsantrasyonu $47,2 \pm 4,4$ ng/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 4.13). Isıl işlem uygulamaları sonucunda, 65 °C’de 30 dakika ($p<0,05$) ve 75 °C’de 15 dakika ($p<0,05$) süreyle işlem gören örneklerde bütirik asit konsantrasyonlarının anlamlı derecede arttığı görülmüştür. 95°C’de 15 dakika uygulamasında da yüksek bir artış ($p<0,05$) gözlemlenmiştir. 15 dakika süre ile 75 °C’de yapılan işlemin aynı sürede diğer sıcaklıklara kıyasla anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu ($p<0,05$), 30 dakika süre ile 65 °C’de yapılan işlemin diğer sıcaklıklara göre anlamlı derecede yüksek olduğu ($p<0,05$) ancak 45 dakika süre ile yapılan uygulamaların arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Bu bulgular, farklı ısıl işlem koşullarının bütirik asit üretimini etkilediğini göstermektedir.

Kontrol grubunda izovalerik asit konsantrasyonu $21,8 \pm 0,8$ ng/mL olarak ölçülmüştür (Tablo 4.13). Isıl işlem süreleri ve sıcaklıkları arttıkça izovalerik asit konsantrasyonlarında anlamlı artışlar kaydedilmiştir. Özellikle 85°C’de 15 dakika ($p<0,05$) ve 95°C’de 10 dakika ($p<0,05$) süreyle işlem gören örneklerde izovalerik asit konsantrasyonlarının belirgin derecede arttığı tespit edilmiştir. 15 dakika süre ile 75 °C ve 85 °C’de yapılan işlemlerin aynı sürede 95 °C’ye kıyasla anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu ($p<0,05$), 45 dakika süre ile 75 °C’de yapılan işlemin diğer sıcaklıklara göre anlamlı derecede yüksek olduğu ($p<0,05$) ancak 30 dakika süre ile yapılan uygulamaların arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Bu artışlar, ısıl işlemin izovalerik asit üretimi üzerinde önemli bir etkisi olduğunu ortaya koymaktadır.

Kontrol grubunda valerik asit konsantrasyonu $0,0 \pm 0,0$ ng/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 4.13). Isıl işlem uygulamaları sonucunda, 65°C'de 30 dakika ($p<0,05$) ve 75°C'de 15 dakika ($p<0,05$) süreyle işlem gören örneklerde valerik asit konsantrasyonlarının anlamlı derecede arttığı görülmüştür. 85°C'de 10 dakika ve 15 dakika uygulamalarında da 30 dakikaya kıyasla yüksek artışlar ($p<0,05$) kaydedilmiştir. 30 dakika süre ile 75 °C'de yapılan işlemin aynı sürede diğer sıcaklıklara göre daha yüksek olduğu anlamlı derecede görülmüştür ($p<0,05$). Bu bulgular, farklı ısıl işlem koşullarının valerik asit üretimini etkilediğini göstermektedir.

Kontrol grubunda hegzanoik asit konsantrasyonu $15,4 \pm 0,2$ ng/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 4.13). Isıl işlem uygulamaları sonucunda, 65 °C'de 90 dakika ($p<0,05$) ve 75 °C'de 15 dakika ($p<0,05$) süreyle işlem gören örneklerde hegzanoik asit konsantrasyonlarının anlamlı derecede arttığı görülmüştür. 15 dakika süre ile 75 °C'de yapılan uygulamanın aynı sürede diğer sıcaklıklara göre anlamlı derecede yüksek olduğu ($p<0,05$) ancak 30 ve 45 dakika sürelerde farklı sıcaklıklarda anlamlı bir fark görülmediği tespit edilmiştir ($p>0,05$).

Isıl işlem uygulamaları, özellikle asetik asit, propiyonik asit ve izobütirik asit konsantrasyonlarında önemli artışlar sağlamıştır. Örneğin, 65°C'de 90 dakika ve 75°C'de 30 dakika süreyle işlem gören örneklerde asetik asit konsantrasyonlarının anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir (Tablo 4.12). Bu artışlar, ısıl işlemin bakteriyel hücre duvarını bozarak hücre içi metabolitlerin serbest kalmasına ve fermentasyon süreçlerinin hızlanmasına bağlı olabilir. Yao ve diğerleri (2022), biyolojik örneklerde KZYA'ların hassas analizinde, özellikle asetik asit, propiyonik asit ve bütirik asidin önemli olduğunu belirtmiştir (Yao, Davidson, Shaikh, Forsyth, Prenni ve Broeckling, 2022).

Propiyonik asit konsantrasyonları da benzer şekilde ısıl işlem süreleri ve sıcaklıkları arttıkça anlamlı artışlar göstermiştir. Özellikle 95°C'de 10 dakika süreyle işlem gören örneklerde propiyonik asit konsantrasyonlarının belirgin derecede arttığı tespit edilmiştir. İzobütirik asit konsantrasyonlarında da artış gözlenmiş olup, 95°C'de 15 dakika süreyle işlem gören örneklerde en yüksek değerlere ulaşılmıştır.

Tablo 4.12 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak ısıtılarak üretilen postbiyotiklerin ilavesi ile *Lacticaseibacillus casei* 431 ortamında oluşan asetik, propiyonik ve izobütirik asitlerin değişimleri üzerindeki etkisi.*

Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Örnek	Asetik Asit		Propiyonik Asit		İzobütirik Asit	
			Konsantrasyon	Oran	Konsantrasyon	Oran	Konsantrasyon	Oran
		Kontrol	5847,7 ± 216,8 ^a	-	20,4 ± 0,3 ^a	-	15,8 ± 0,5 ^a	-
65	30	1	7131,7 ± 107,8 ^{ef,xy,C}	22,0	24,1 ± 2,3 ^{bcde,x,A}	18,3	20,1 ± 0,7 ^{bcde,x,B}	27,3
	45	2	6810,0 ± 19,8 ^{de,x,AB}	16,5	22,2 ± 0,3 ^{ab,x,A}	8,7	21,9 ± 0,3 ^{cdefg,x,AB}	38,3
	60	3	6594,4 ± 195,3 ^{bcde,x,AB}	12,8	23,9 ± 1,2 ^{bcd,x,A}	17,3	20,9 ± 2,5 ^{bcde,x,A}	32,1
	90	4	7679,9 ± 333,4 ^{f,y,B}	31,3	24,2 ± 0,5 ^{bcde,x,A}	18,8	21,8 ± 0,3 ^{cdefg,x,A}	37,8
75	15	5	6654,8 ± 59,7 ^{bcde,y,B}	13,8	27,0 ± 2,2 ^{de,x,A}	32,5	16,2 ± 0,7 ^{a,x,A}	2,4
	30	6	7167,2 ± 1,8 ^{ef,z,B}	22,6	27,3 ± 1,0 ^{e,x,B}	34,1	17,7 ± 1,1 ^{ab,x,A}	11,9
	45	7	6435,1 ± 135,9 ^{abcd,xy,A}	10,0	25,4 ± 1,6 ^{bcde,x,A}	24,7	23,7 ± 1,1 ^{efgh,y,AB}	49,9
	60	8	6383,0 ± 93,1 ^{abcd,x,A}	9,2	25,5 ± 0,1 ^{bcde,x,A}	25,0	22,5 ± 2,7 ^{defg,y,A}	42,5
85	10	9	5899,7 ± 117,5 ^{a,x,A}	0,9	23,1 ± 2,0 ^{abc,x,A}	13,4	22,8 ± 0,4 ^{defgh,y,C}	44,3
	15	10	5893,9 ± 203,1 ^{a,x,A}	0,8	26,4 ± 1,8 ^{cde,x,AB}	29,3	24,8 ± 0,2 ^{fgh,y,B}	56,5
	30	11	6036,3 ± 56,4 ^{ab,x,A}	3,2	25,4 ± 0,7 ^{bcde,x,A}	24,8	19,8 ± 1,5 ^{bcd,x,A}	25,4
	45	12	6091,9 ± 220,0 ^{abc,x,A}	4,2	24,0 ± 0,4 ^{bcde,x,A}	17,7	18,8 ± 1,4 ^{abc,x,A}	18,9
95	5	13	6629,4 ± 182,6 ^{bcde,x,B}	13,4	23,4 ± 0,1 ^{abc,x,A}	14,9	20,1 ± 0,8 ^{bcde,x,B}	27,0
	10	14	6944,5 ± 745,1 ^{de,x,AB}	18,8	30,7 ± 2,4 ^{f,y,B}	50,8	25,4 ± 3,8 ^{gh,xy,B}	60,5
	15	15	7155,8 ± 369,6 ^{ef,x,B}	22,4	23,7 ± 1,1 ^{bcd,x,A}	16,4	26,1 ± 1,3 ^{h,y,B}	65,2
	30	16	6693,2 ± 330,2 ^{cde,x,A}	14,5	23,7 ± 1,5 ^{bcd,x,A}	16,1	21,7 ± 0,5 ^{cdef,xy,A}	37,5

* Konsantrasyon değerleri ng/mL cinsinden ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Artış oranı yüzde olarak verilmiştir. Üst indis olarak kullanılan harfler (a-h) aynı ise örnekler arasında fark olmadığı; (x-z) aynı ise aynı sıcaklıktaki farklı işlem süreleri arasında fark olmadığı; (A-D) aynı ise aynı işlem sürelerinde farklı sıcaklıklar arasında fark olmadığı anlaşılmaktadır (p>0,05).

Tablo 4.13 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak ısıt işleme üretilen postbiyotiklerin ilavesi ile *Lacticaseibacillus casei* 431 ortamında oluşan bütirik, izovalerik, valerik ve hegzanoik asitlerin değişimleri üzerindeki etkisi.*

Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Örnek	Bütirik Asit		İzovalerik Asit		Valerik Asit		Hegzanoik Asit	
			Konsantrasyon	Oran	Konsantrasyon	Oran	Konsantrasyon	Oran	Konsantrasyon	Oran
			Kontrol	47,2 ± 4,4 ^a	-	21,8 ± 0,8 ^a	-	0,0 ± 0,0 ^a	-	15,4 ± 0,2 ^a
65	30	1	62,9 ± 0,9 ^{ef,y,C}	33,3	30,2 ± 4,4 ^{def,x,AB}	38,3	16,9 ± 1,4 ^{c,z,B}	-	16,7 ± 0,9 ^{ab,x,A}	8,4
	45	2	51,0 ± 0,2 ^{abc,x,A}	8,0	27,1 ± 1,6 ^{bcd,x,A}	24,1	14,3 ± 0,2 ^{b,y,B}	-	17,4 ± 1,2 ^{ab,xy,A}	12,6
	60	3	49,0 ± 3,0 ^{ab,x,A}	3,8	23,7 ± 0,9 ^{ab,x,A}	8,5	14,7 ± 0,3 ^{b,y,AB}	-	16,1 ± 0,5 ^{a,x,A}	3,9
	90	4	62,5 ± 4,8 ^{ef,y,B}	32,3	28,2 ± 1,0 ^{bcde,x,B}	29,3	0,0 ± 0,0 ^{a,x,A}	-	19,8 ± 1,1 ^{c,y,B}	28,0
75	15	5	71,5 ± 0,7 ^{g,y,D}	51,6	33,9 ± 0,8 ^{fg,x,B}	55,5	21,4 ± 0,1 ^{e,y,C}	-	26,7 ± 0,2 ^{e,z,B}	73,1
	30	6	57,5 ± 3,1 ^{cde,x,A}	21,8	32,1 ± 2,6 ^{efg,x,AB}	47,2	18,7 ± 1,5 ^{cd,x,C}	-	18,5 ± 0,1 ^{bc,x,A}	20,0
	45	7	58,3 ± 1,1 ^{de,x,AB}	23,5	33,1 ± 2,2 ^{efg,x,B}	51,8	17,2 ± 0,6 ^{c,x,B}	-	17,4 ± 1,0 ^{ab,x,A}	12,9
	60	8	53,1 ± 1,7 ^{abcd,x,A}	12,4	35,9 ± 2,5 ^{g,x,C}	64,6	19,1 ± 0,9 ^{d,xy,B}	-	22,3 ± 0,2 ^{d,y,B}	44,6
85	10	9	54,4 ± 0,7 ^{abcd,x,B}	15,2	29,4 ± 3,1 ^{cdef,xy,AB}	34,8	19,6 ± 1,0 ^{de,z,C}	-	15,7 ± 0,4 ^{a,x,A}	1,9
	15	10	56,0 ± 1,4 ^{bcde,x,A}	18,7	34,0 ± 1,9 ^{fg,z,B}	55,8	19,7 ± 1,3 ^{de,z,C}	-	16,6 ± 0,7 ^{ab,x,A}	7,3
	30	11	52,9 ± 0,9 ^{abcd,x,A}	12,0	28,6 ± 3,4 ^{bcde,xy,AB}	30,9	13,3 ± 2,0 ^{b,y,B}	-	16,5 ± 0,9 ^{ab,x,A}	7,0
	45	12	51,8 ± 2,9 ^{abcd,x,A}	9,8	24,6 ± 1,1 ^{abc,x,AB}	12,6	0,0 ± 0,0 ^{a,x,A}	-	16,4 ± 0,8 ^{ab,x,A}	6,5
95	5	13	50,1 ± 0,9 ^{ab,x,A}	6,1	24,6 ± 0,5 ^{abc,xy,A}	12,6	0,0 ± 0,0 ^{a,A}	-	16,0 ± 0,5 ^{a,x,A}	3,7
	10	14	57,7 ± 5,2 ^{cde,xy,A}	22,3	32,4 ± 1,9 ^{efg,z,AB}	48,5	0,0 ± 0,0 ^{a,A}	-	18,6 ± 2,0 ^{bc,x,A}	20,7
	15	15	67,9 ± 6,6 ^{fg,y,B}	43,9	27,0 ± 0,6 ^{bcd,y,A}	23,6	0,0 ± 0,0 ^{a,A}	-	17,4 ± 1,8 ^{ab,x,A}	12,5
	30	16	48,9 ± 2,1 ^{ab,x,A}	3,6	21,9 ± 1,4 ^{a,x,A}	0,4	0,0 ± 0,0 ^{a,A}	-	16,5 ± 1,6 ^{ab,x,A}	6,7

* Konsantrasyon değerleri ng/mL cinsinden ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Artış oranı yüzde olarak verilmiştir. Üst indis olarak kullanılan harfler (a-h) aynı ise örnekler arasında fark olmadığı; (x-z) aynı ise aynı sıcaklıktaki farklı işlem süreleri arasında fark olmadığı; (A-D) aynı ise aynı işlem sürelerinde farklı sıcaklıklar arasında fark olmadığı anlaşılmaktadır (p>0,05).

Bütirik asit, izovalerik asit, valerik asit ve hegzanoik asit konsantrasyonlarında da benzer artışlar kaydedilmiştir (Tablo 4.13). Özellikle 75°C'de 15 dakika süreyle işlem gören örneklerde bütirik asit konsantrasyonlarının arttığı görülmüştür. Bu bulgular, Martyniak ve diğerleri (2021) çalışmasında farklı ısı işlem koşullarının KZYA üretimi üzerindeki etkilerini detaylandırarak desteklenmektedir. Bu çalışmada, farklı ısı işlem koşullarının bağırsak mikrobiyotasındaki KZYA üretimi üzerindeki etkileri incelenmiştir (Martyniak, Medyńska-Przęczek, Wędrychowicz, Skoczeń ve Tomasik, 2021). Araştırma, özellikle yüksek sıcaklık ve uzun süreli işlemlerin KZYA üretiminde belirgin artışlar sağladığını göstermiştir. Bu sonuçlar, bizim bulgularımızla uyumludur.

4.3.2. Isıl İşleme Üretilmiş Postbiyotiklerin *Bifidobacterium* Kültürü Ortamındaki KZYA Etkileri

Kontrol grubunda asetik asit konsantrasyonu $2304,0 \pm 20,4$ ng/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 4.14). Isıl işlem uygulamaları sonucunda, 65 °C'de 60 dakika ($p<0,05$) ve 90 dakika ($p<0,05$) süreyle işlem gören örnekler ve 85 °C'de 30 dakika süreyle yapılan işlemin asetik asit konsantrasyonlarının anlamlı derecede arttığı görülmüştür ($p<0,05$). 95 °C'de 30 dakika ($p<0,05$) uygulamalarında da yüksek artışlar gözlemlenmiştir. 45 dakika süre ile yapılan 65 °C sıcaklıktaki işlem aynı süredeki diğer sıcaklıklara göre daha yüksek bir artış oranına sahiptir ($p<0,05$). Bu bulgular, farklı ısı işlem koşullarının asetik asit üretimini etkilediğini göstermektedir.

Kontrol grubunda propiyonik asit konsantrasyonu $14,2 \pm 0,2$ ng/mL olarak ölçülmüştür (Tablo 4.14). Isıl işlem süreleri ve sıcaklıkları arttıkça propiyonik asit konsantrasyonlarında anlamlı artışlar kaydedilmiştir. Özellikle 65 °C'de 60 dakika ($p<0,05$) ve 85°C'de 15 dakika ($p<0,05$) süreyle işlem gören örneklerde propiyonik asit konsantrasyonlarının belirgin derecede arttığı tespit edilmiştir. 15 dakika süre ile 85 °C'de yapılan işlemin oranının 75 °C ve 95 °C'de yapılan işlemlere göre yüksek olduğu gözlemlenmiştir ($p<0,05$). 30 dakikada 75 °C'de yapılan işlemlerin ise anlamlı bir farkla aynı süredeki farklı sıcaklıklardan daha yüksek bir artışa sahip olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Bu artışlar, ısı işlemin propiyonik asit üretimi üzerinde önemli bir etkisi olduğunu ortaya koymaktadır.

Kontrol grubunda izobütirik asit konsantrasyonu $13,3 \pm 0,6$ ng/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 4.14). Isıl işlem süresi ve sıcaklığın artmasıyla izobütirik asit konsantrasyonlarında önemli artışlar gözlenmiştir. Özellikle 65 °C'de 30 dakika ($p<0,05$) ve 95 °C'de 30 dakika ($p<0,05$) süreyle işlem gören örneklerde izobütirik asit konsantrasyonlarının en yüksek değerlere ulaştığı görülmüştür. 30 dakika süre ile 65 °C ve 75 °C'de yapılan işlemlerin aynı sürede 85 °C'de yapılan işlemde anlamlı derecede yüksek olduğu ($p<0,05$) ancak 75 °C'deki işlemin 95 °C'deki işlemde anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bu sonuçlar, ısıl işlemin izobütirik asit üretimini de önemli derecede etkilediğini göstermektedir.

Kontrol grubunda bütirik asit konsantrasyonu $28,2 \pm 0,8$ ng/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 4.15). Isıl işlem uygulamaları sonucunda, 65°C'de 60 dakika ($p<0,05$) ve 90 dakika ($p<0,05$) süreyle işlem gören örneklerde bütirik asit konsantrasyonlarının anlamlı derecede arttığı görülmüştür. 75°C'de 30 dakika ($p<0,05$) ve 95°C'de 30 dakika ($p<0,05$) uygulamalarında da yüksek artışlar gözlemlenmiştir. Aynı sürelerde farklı sıcaklıkların etkisine bakıldığında, örneğin 30 dakika süresince 85 °C ve 95 °C'de yapılan işlemlerin 65 °C'ye göre anlamlı bir şekilde daha yüksek bir orana sahip olduğu görülmüştür ($p<0,05$). 15 dakika süre ile 85 °C'de yapılmış olan işlem de aynı sürede diğer sıcaklıklarda yapılan işleme göre anlamlı derecede yüksektir ($p<0,05$). Bu bulgular, farklı ısıl işlem koşullarının bütirik asit üretimini etkilediğini göstermektedir.

Kontrol grubunda izovalerik asit konsantrasyonu $15,4 \pm 1,0$ ng/mL olarak ölçülmüştür (Tablo 4.15). Isıl işlem süreleri ve sıcaklıkları arttıkça izovalerik asit konsantrasyonlarında anlamlı artışlar kaydedilmiştir. Özellikle 75°C, 60 dakikada yapılan işlemin aynı sıcaklıktaki 15 ve 30 dakikalarda yapılan işlemlerden anlamlı derecede yüksek olduğu ($p<0,05$) ve 95°C'de 5 dakika süreyle işlem gören örneklerin de aynı sıcaklıktaki diğer işlemlerden anlamlı derecede yüksek bir orana sahip olduğu görülmüştür ($p<0,05$). 15, 30 ve 45 dakika süreler ile 85 °C'de yapılan işlemlerin aynı sürelerde farklı sıcaklıklarda yapılan işlemlerden anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bu artışlar, ısıl işlemin izovalerik asit üretimi üzerinde önemli bir etkisi olduğunu ortaya koymaktadır.

Tablo 4.14 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak ısıtıl işlemle üretilen postbiyotiklerin ilavesi ile *Bifidobacterium* kültürü ortamında oluşan asetik, propiyonik ve izobütirik asitlerin değişimleri üzerindeki etkisi.*

Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Örnek	Asetik Asit		Propiyonik Asit		İzobütirik Asit	
			Konsantrasyon	Oran	Konsantrasyon	Oran	Konsantrasyon	Oran
			Kontrol					
			2304,0 ± 20,4 ^a	-	14,2 ± 0,2 ^a	-	13,3 ± 0,6 ^a	-
65	30	1	2784,5 ± 59,7 ^{c,x,B}	20,9	15,6 ± 0,4 ^{ab,y,A}	10,3	18,6 ± 1,5 ^{c,y,B}	40,4
	45	2	6129,4 ± 10,7 ^{f,y,C}	166,0	14,4 ± 0,3 ^{a,x,A}	2,0	16,4 ± 1,5 ^{bc,xy,B}	23,9
	60	3	6788,4 ± 232,9 ^{h,z,C}	194,6	21,5 ± 0,6 ^{d,z,B}	51,6	15,4 ± 1,3 ^{ab,xy,A}	15,8
	90	4	6521,5 ± 141,0 ^{g,z,C}	183,1	16,6 ± 0,1 ^{abc,y,A}	17,3	14,2 ± 0,5 ^{ab,x,A}	7,1
75	15	5	2590,2 ± 54,6 ^{bc,x,B}	12,4	19,3 ± 0,8 ^{cd,x,B}	36,6	15,4 ± 0,2 ^{ab,x,A}	15,9
	30	6	2667,8 ± 57,7 ^{c,x,B}	15,8	18,3 ± 0,8 ^{bc,x,B}	29,2	16,3 ± 0,1 ^{bc,x,B}	22,8
	45	7	2643,3 ± 45,3 ^{bc,x,A}	14,7	17,6 ± 2,2 ^{bc,x,AB}	24,5	15,2 ± 0,5 ^{ab,x,A}	14,7
	60	8	2718,9 ± 100,7 ^{c,x,A}	18,0	16,9 ± 0,5 ^{abc,x,A}	19,2	15,6 ± 0,9 ^{ab,x,A}	17,6
85	10	9	2634,1 ± 139,4 ^{bc,x,B}	14,3	17,7 ± 2,0 ^{bc,x,AB}	24,9	16,4 ± 1,2 ^{bc,x,AB}	23,6
	15	10	2647,6 ± 101,7 ^{bc,x,AB}	14,9	24,7 ± 0,2 ^{e,y,C}	74,4	14,6 ± 0,6 ^{ab,x,AB}	10,0
	30	11	3251,5 ± 68,2 ^{d,y,B}	41,1	18,4 ± 2,0 ^{bc,x,AB}	29,6	15,4 ± 1,9 ^{ab,x,A}	16,2
	45	12	2733,2 ± 3,1 ^{c,x,A}	18,6	18,8 ± 2,3 ^{cd,x,A}	32,7	14,9 ± 1,8 ^{ab,x,A}	12,6
95	5	13	2352,9 ± 15,5 ^{a,x,A}	2,1	14,6 ± 0,5 ^{a,x,A}	2,9	14,9 ± 0,6 ^{ab,A}	12,1
	10	14	2421,9 ± 118,4 ^{ab,xy,A}	5,1	14,3 ± 0,8 ^{a,x,A}	0,9	13,5 ± 0,5 ^{a,A}	1,7
	15	15	2625,3 ± 19,7 ^{bc,y,A}	13,9	15,7 ± 2,0 ^{ab,xy,A}	10,9	15,7 ± 0,9 ^{ab,A}	18,5
	30	16	4767,5 ± 132,5 ^{e,z,B}	106,9	18,3 ± 0,5 ^{bc,y,A}	29,1	16,5 ± 1,1 ^{bc,A}	24,1

* Konsantrasyon değerleri ng/mL cinsinden ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Artış oranı yüzde olarak verilmiştir. Üst indis olarak kullanılan harfler (a-h) aynı ise örnekler arasında fark olmadığı; (x-z) aynı ise aynı sıcaklıktaki farklı işlem süreleri arasında fark olmadığı; (A-D) aynı ise aynı işlem sürelerinde farklı sıcaklıklar arasında fark olmadığı anlaşılmaktadır (p>0,05).

Kontrol grubunda valerik asit konsantrasyonu $0,0 \pm 0,0$ ng/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 4.15). Isıl işlem uygulamaları sonucunda, 65°C'de 30 dakika ($p<0,05$) ve 85°C'de 10 dakika ($p<0,05$) süreyle işlem gören örneklerde valerik asit konsantrasyonlarının anlamlı derecede arttığı görülmüştür. 15 dakika süre ile 85 °C'de yapılan işlemin aynı sürede farklı sıcaklıklardaki işlemlerden anlamlı derecede yüksek olduğu ($p<0,05$) ve 30 dakika süre ile 75 °C ve 85 °C'de yapılan işlemlerin 95 °C'den anlamlı derecede yüksek olduğu ($p<0,05$) ancak 45 dakikada yapılan işlemlerde farklı sıcaklıklar arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Bu bulgular, farklı ısı işlem koşullarının valerik asit üretimini etkilediğini göstermektedir.

Kontrol grubunda hegzanoik asit konsantrasyonu $11,8 \pm 0,3$ ng/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 4.15). Isıl işlem süresi ve sıcaklığın artmasıyla hegzanoik asit konsantrasyonlarında önemli artışlar gözlenmiştir. Özellikle 65 °C'de 30 dakika ($p<0,05$) süreyle işlem gören örneğin 60 ve 90 dakika süreyle yapılan işlemlerin hegzanoik asit konsantrasyonunun anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. 75 °C, 85 °C ve 95 °C'de farklı süreler ile yapılan işlemler arasında anlamlı bir fark görülememiştir ($p>0,05$). 30 ve 45 dakika süre ile 65 °C'de yapılan işlemlerin diğer sıcaklıklarda yapılan işlemlerden anlamlı derecede yüksek olduğu ($p<0,05$) ancak 15 dakika süre ile farklı sıcaklıklarda yapılan işlemler arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p>0,05$). Bu sonuçlar, ısıl işlemin hegzanoik asit üretimini de önemli derecede etkilediğini göstermektedir.

Isıl işlemle inaktive edilerek *L. casei*'den elde edilen postbiyotiklerin *Bifidobacterium* kültürlerinde de benzer etkileri gözlenmiştir (Tablo 4.14). Asetik asit, propiyonik asit ve izobütirik asit konsantrasyonları, özellikle 65°C'de 60 dakika ve 90 dakika süreyle işlem gören örneklerde anlamlı derecede artmıştır. Bu bulgular, Teame ve diğerleri (2020) çalışmasında postbiyotiklerin bağışıklık sistemi üzerindeki olumlu etkileriyle uyumludur (Teame, Wang, Xie, Zhang, Yang, Ding ve Zhou, 2020).

Tablo 4.15 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak ısıtıl işlemle üretilen postbiyotiklerin ilavesi ile *Bifidobacterium* kültürü ortamında oluşan bütirik, izovalerik, valerik ve hegzanoik asitlerin değişimleri üzerindeki etkisi.*

Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Örnek	Bütirik Asit		İzovalerik Asit		Valerik Asit		Hegzanoik Asit	
			Konsantrasyon	Oran	Konsantrasyon	Oran	Konsantrasyon	Oran	Konsantrasyon	Oran
			Kontrol	28,2 ± 0,8 ^a	-	15,4 ± 1,0 ^a	-	0,0 ± 0,0 ^a	-	11,8 ± 0,3 ^a
65	30	1	30,5 ± 4,4 ^{ab,x,A}	8,3	20,4 ± 1,9 ^{cd,y,AB}	32,2	24,0 ± 0,6 ^{h,y,C}	-	18,4 ± 0,7 ^{e,z,C}	56,6
	45	2	36,0 ± 2,4 ^{cd,x,BC}	27,5	19,9 ± 1,6 ^{bcd,y,A}	29,0	15,5 ± 1,2 ^{bcd,x,AB}	-	17,6 ± 0,2 ^{de,yz,B}	49,6
	60	3	50,4 ± 1,3 ^{g,y,C}	78,8	22,8 ± 1,2 ^{de,y,B}	47,9	16,3 ± 0,9 ^{cde,x,A}	-	16,2 ± 1,0 ^{bcd,xy,A}	37,9
	90	4	47,6 ± 1,8 ^{g,y,B}	68,6	15,8 ± 0,2 ^{a,x,A}	2,2	14,6 ± 0,6 ^{bc,x,A}	-	15,0 ± 0,1 ^{bc,x,A}	27,9
75	15	5	28,8 ± 1,6 ^{a,x,A}	2,2	15,9 ± 0,3 ^{a,x,A}	3,3	0,0 ± 0,0 ^{a,x,A}	-	16,5 ± 0,8 ^{bcd,e,x,AB}	39,9
	30	6	32,5 ± 1,4 ^{abc,yz,AB}	15,1	17,3 ± 1,2 ^{abc,x,A}	12,1	16,1 ± 0,1 ^{cde,y,B}	-	15,8 ± 0,2 ^{bcd,x,AB}	34,6
	45	7	31,0 ± 0,4 ^{ab,xy,A}	10,0	18,3 ± 0,0 ^{abc,xy,A}	18,3	19,1 ± 0,4 ^{fg,z,B}	-	14,9 ± 0,5 ^{bc,x,A}	26,4
	60	8	34,4 ± 0,9 ^{bcd,z,A}	22,0	23,0 ± 3,8 ^{de,y,BC}	49,0	18,5 ± 1,4 ^{ef,z,AB}	-	15,8 ± 0,9 ^{bcd,x,A}	34,4
85	10	9	30,5 ± 0,3 ^{ab,x,A}	8,2	16,6 ± 2,1 ^{ab,x,A}	7,7	31,8 ± 0,1 ^{i,y,D}	-	16,9 ± 0,7 ^{cde,x,BC}	43,6
	15	10	37,7 ± 1,7 ^{de,y,C}	33,6	24,0 ± 1,0 ^{e,y,B}	55,4	17,9 ± 0,1 ^{def,x,C}	-	16,4 ± 0,9 ^{bcd,e,x,AB}	39,5
	30	11	40,7 ± 0,7 ^{ef,y,B}	44,3	24,2 ± 1,7 ^{e,y,B}	56,7	21,1 ± 1,3 ^{g,x,B}	-	17,3 ± 1,8 ^{de,x,A}	47,4
	45	12	37,4 ± 2,2 ^{de,y,A}	32,4	26,4 ± 2,1 ^{e,y,C}	70,8	21,1 ± 2,5 ^{g,x,B}	-	16,9 ± 1,9 ^{cde,x,A}	43,7
95	5	13	28,6 ± 1,1 ^{a,x,A}	1,5	23,9 ± 1,3 ^{e,y,B}	54,8	15,3 ± 0,5 ^{bcd,x,B}	-	14,9 ± 0,2 ^{bc,x,A}	26,8
	10	14	29,0 ± 0,6 ^{a,x,A}	2,8	13,8 ± 0,4 ^{abc,x,A}	19,3	13,8 ± 0,1 ^{bc,x,A}	-	14,7 ± 0,8 ^{b,x,A}	25,1
	15	15	28,6 ± 2,0 ^{a,x,A}	1,3	17,7 ± 0,5 ^{abc,x,A}	14,6	15,6 ± 0,8 ^{bcd,x,A}	-	15,2 ± 0,5 ^{bc,x,A}	29,5
	30	16	43,1 ± 2,0 ^{f,y,B}	52,7	17,6 ± 0,2 ^{abc,x,AB}	14,3	13,2 ± 2,4 ^{b,x,A}	-	15,8 ± 0,5 ^{bcd,x,A}	34,3

* Konsantrasyon değerleri ng/mL cinsinden ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Artış oranı yüzde olarak verilmiştir. Üst indis olarak kullanılan harfler (a-i) aynı ise örnekler arasında fark olmadığı; (x-z) aynı ise aynı sıcaklıktaki farklı işlem süreleri arasında fark olmadığı; (A-D) aynı ise aynı işlem sürelerinde farklı sıcaklıklar arasında fark olmadığı anlaşılmalıdır (p>0,05).

Bütirik asit, izovalerik asit, valerik asit ve hegzanoik asit konsantrasyonları da artış göstermiştir (Tablo 4.15). Özellikle 75°C'de 30 dakika ve 95°C'de 30 dakika süreyle işlem gören örneklerde bütirik asit konsantrasyonlarının yüksek oranlarda arttığı tespit edilmiştir. Bu bulgular, Żółkiewicz ve diğerleri (2020) tarafından yapılan çalışmada postbiyotiklerin bağırsak mikrobiyotasını modüle edici etkileriyle desteklenmektedir (Żółkiewicz, Marzec, Ruszczyński ve Feleszko, 2020).

Teame ve diğerlerinin (2020), yaptıkları çalışmada, postbiyotiklerin bağışıklık sistemi üzerindeki etkileri incelenmiş ve bu bileşiklerin bağışıklık modülasyonu üzerindeki olumlu etkileri vurgulanmıştır. Farklı işlem koşullarının KZYA üretimini nasıl etkilediği detaylandırılmıştır ve bizim bulgularımızla uyumludur.

4.3.3. Ultrasesle Üretilmiş Postbiyotiklerin *L. casei* Ortamındaki KZYA Etkileri

Kontrol grubunda asetik asit konsantrasyonu $5642,1 \pm 12,4$ ng/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 4.16). Ultrases işlemi uygulamaları sonucunda, 172 µm genlikte 30 dakika ($p<0,05$) süreyle işlem gören örneklerde asetik asit konsantrasyonlarının anlamlı derecede arttığı görülmüştür. 246 µm genlikte 45 dakika ($p<0,05$) ve 320 µm genlikte 60 dakika ($p<0,05$) uygulamalarında ise azalmalar gözlemlenmiştir. Aynı sürelerde farklı genliklerin etkisine bakıldığında, örneğin 45 dakika süresince 172 µm genliğinin anlamlı derecede 246 µm ($p<0,05$, %31,8 azalma) genliğinin asetik asit konsantrasyonundan yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$). 60 dakikada ise en yüksek oran 98 µm'den elde edilmiştir ve uygulanan genlik arttıkça konsantrasyon oranının azaldığı tespit edilmiştir ve bu sonuç anlamlıdır ($p<0,05$). Bu bulgular, farklı ultrases işlem koşullarının asetik asit üretimini etkilediğini göstermektedir.

Kontrol grubunda propiyonik asit konsantrasyonu $18,0 \pm 0,5$ ng/mL olarak ölçülmüştür (Tablo 4.16). Ultrases işlem süreleri ve genlikleri arttıkça propiyonik asit konsantrasyonlarında anlamlı artışlar kaydedilmiştir. Özellikle 98 µm genlikte 60 dakika ($p<0,05$) ve 246 µm genlikte 45 dakika ($p<0,05$) süreyle işlem gören örneklerde propiyonik asit konsantrasyonlarının belirgin derecede arttığı tespit edilmiştir. Aynı sürelerde farklı genliklerin etkisine bakıldığında, 60 dakika süresince 98 µm genlikte yapılan işlemlerin diğer genliklere kıyasla daha yüksek olduğu ve aynı sürede, uygulanan genlikler arttıkça

konsantrasyon oranlarının anlamlı derecede düştüğü görülmüştür ($p<0,05$). 45 dakika süre ile 246 μm genlikte yapılan işlemin ise anlamlı derecede 98 μm ve 172 μm genlikte yapılan işlemlerden daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu artışlar, ultrases işleminin propiyonik asit üretimi üzerinde önemli bir etkisi olduğunu ortaya koymaktadır.

Kontrol grubunda izobütirik asit konsantrasyonu $13,8 \pm 0,2$ ng/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 4.16). Ultrases işlem süresi ve genliğin artmasıyla izobütirik asit konsantrasyonlarında önemli artışlar gözlenmiştir. Özellikle 246 μm genlikte 45 dakika süreyle işlem gören örneklerde izobütirik asit konsantrasyonlarının en yüksek değerlere ulaştığı ve diğer örneklerden anlamlı derecede farklı olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Aynı sürelerde farklı genliklerin etkisine bakıldığında, anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Bu sonuçlar, ultrases işleminin izobütirik asit üretimini de önemli derecede etkilediğini göstermektedir.

Kontrol grubunda bütirik asit konsantrasyonu $37,7 \pm 1,2$ ng/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 4.17). 172 μm genlikte 60 dakika süre ile işlem yapılan örneğin anlamlı derecede aynı genlikte farklı sürelerde işlem gören diğer örneklerin oranından yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Bu işlem aynı zamanda diğer örneklerden de anlamlı derecede yüksektir ($p<0,05$). 45 dakika süre ile işlem gören örneklerin oranları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0,05$) ancak 60 dakika süre ile 172 μm genlikte yapılan uygulamanın aynı sürenin farklı genliklerinden anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Kontrol grubunda izovalerik asit konsantrasyonu $17,9 \pm 0,3$ ng/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 4.17). 2, 8 ve 11 numaralı örneklerin konsantrasyon oranı arasında anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$) ancak bu örneklerin diğer örneklerden anlamlı derecede daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). 172 μm genlikte 45 ve 60 dakikada yapılan işlemlerin 30 dakika süre ile yapılan işlemde anlamlı derecede yükseklerdir ($p<0,05$). 60 dakika süre ile 172 μm genlikteki uygulamanın 320 μm genliktekinden anlamlı derecede yüksek olduğu ($p<0,05$) gözlemlenmiş ancak 45 dakika süre ile farklı genliklerde yapılan işlemlerin arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

Tablo 4.16 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak ultrases işlemi ile üretilen postbiyotiklerin ilavesi ile *Lacticaseibacillus casei* 431 ortamında oluşan asetik, propiyonik ve izobütirik asitlerin değişimleri üzerindeki etkisi.*

Genlik (μm)	Süre (dk)	Örnek	Asetik Asit		Propiyonik Asit		İzobütirik Asit	
			Konsantrasyon	Oran	Konsantrasyon	Oran	Konsantrasyon	Oran
		Kontrol	5642,1 $\pm$ 12,4 ^c	-	18,0 $\pm$ 0,5 ^a	-	13,8 $\pm$ 0,2 ^a	-
98	30	2	6763,5 $\pm$ 277,5 ^{e,x}	19,9	25,7 $\pm$ 2,4 ^{cd,xy}	42,9	18,8 $\pm$ 0,2 ^{bc,x}	35,5
	45	3	6786,5 $\pm$ 420,9 ^{e,x,B}	20,3	23,6 $\pm$ 0,6 ^{c,x,A}	31,5	19,6 $\pm$ 1,8 ^{c,x,A}	41,7
	60	4	6363,6 $\pm$ 159,8 ^{d,x,D}	12,8	29,8 $\pm$ 1,0 ^{e,y,C}	65,7	19,2 $\pm$ 0,9 ^{bc,x,A}	38,4
172	30	6	7427,6 $\pm$ 45,4 ^{f,z}	31,6	23,5 $\pm$ 1,8 ^{c,x}	30,8	17,8 $\pm$ 0,8 ^{bc,x}	28,4
	45	7	6920,4 $\pm$ 168,7 ^{e,y,B}	22,7	22,2 $\pm$ 0,3 ^{bc,x,A}	23,7	19,8 $\pm$ 0,4 ^{c,x,A}	43,2
	60	8	5814,6 $\pm$ 69,6 ^{c,x,C}	3,1	23,1 $\pm$ 1,7 ^{bc,x,AB}	28,8	18,3 $\pm$ 1,8 ^{bc,x,A}	32,3
246	45	11	3847,3 $\pm$ 66,6 ^{b,A}	-31,8	30,7 $\pm$ 0,9 ^{e,B}	70,9	23,6 $\pm$ 1,3 ^{d,A}	70,3
	60	12	3939,1 $\pm$ 41,1 ^{b,B}	-30,2	27,5 $\pm$ 2,3 ^{de,BC}	53,0	17,0 $\pm$ 0,6 ^{b,A}	23,0
320	60	16	3204,9 $\pm$ 13,6 ^{a,A}	-43,2	19,7 $\pm$ 2,0 ^{ab,A}	9,7	16,8 $\pm$ 0,7 ^{b,A}	21,3

* Konsantrasyon değerleri ng/mL cinsinden ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Artış oranı yüzde olarak verilmiştir. Üst indis olarak kullanılan harfler (a-h) aynı ise örnekler arasında fark olmadığı; (x-z) aynı ise aynı sıcaklıktaki farklı işlem süreleri arasında fark olmadığı; (A-D) aynı ise aynı işlem sürelerinde farklı sıcaklıklar arasında fark olmadığı anlaşılmaktadır ($p>0,05$).

Tablo 4.17 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak ultrases işlemi ile üretilen postbiyotiklerin ilavesi ile *Lacticaseibacillus casei* 431 ortamında oluşan bütirik, izovalerik, valerik ve hegzanoik asitlerin değişimleri üzerindeki etkisi.*

Genlik (μm)	Süre (dk)	Örnek	Bütirik Asit		İzovalerik Asit		Valerik Asit		Hegzanoik Asit	
			Konsantrasyon	Oran	Konsantrasyon	Oran	Konsantrasyon	Oran	Konsantrasyon	Oran
			Kontrol							
			37,7 $\pm$ 1,2 ^a	-	17,9 $\pm$ 0,3 ^a	-	0,0 $\pm$ 0,0 ^a	-	14,6 $\pm$ 0,1 ^a	-
98	30	2	58,9 $\pm$ 2,4 ^{e,x}	55,9	29,4 $\pm$ 0,1 ^{def,x}	64,1	0,0 $\pm$ 0,0 ^a	-	16,5 $\pm$ 1,9 ^{abc,x}	13,3
	45	3	56,1 $\pm$ 0,7 ^{de,x,A}	48,7	25,0 $\pm$ 1,3 ^{cd,x,A}	39,9	0,0 $\pm$ 0,0 ^{a,A}	-	20,7 $\pm$ 0,5 ^{d,x,B}	42,3
	60	4	58,6 $\pm$ 5,2 ^{e,x,B}	55,3	26,6 $\pm$ 4,0 ^{cde,x,AB}	48,8	0,0 $\pm$ 0,0 ^{a,A}	-	17,1 $\pm$ 1,1 ^{bc,x,A}	17,3
172	30	6	45,0 $\pm$ 2,5 ^{bc,x}	19,1	19,9 $\pm$ 0,4 ^{ab,x}	11,3	0,0 $\pm$ 0,0 ^a	-	18,2 $\pm$ 0,7 ^{c,x}	25,2
	45	7	50,1 $\pm$ 5,6 ^{cd,x,A}	32,6	28,0 $\pm$ 2,4 ^{cde,y,A}	56,5	0,0 $\pm$ 0,0 ^{a,A}	-	17,6 $\pm$ 0,3 ^{bc,x,A}	21,1
	60	8	69,3 $\pm$ 0,1 ^{f,y,C}	83,7	31,2 $\pm$ 1,1 ^{ef,y,B}	74,2	0,0 $\pm$ 0,0 ^{a,A}	-	17,7 $\pm$ 0,5 ^{bc,x,A}	21,5
246	45	11	46,2 $\pm$ 0,1 ^{bc,A}	22,4	33,2 $\pm$ 4,1 ^{f,A}	85,6	34,3 $\pm$ 0,4 ^{d,B}	-	16,3 $\pm$ 0,6 ^{abc,A}	11,6
	60	12	42,3 $\pm$ 1,4 ^{ab,A}	11,9	27,4 $\pm$ 1,5 ^{cde,AB}	53,3	25,4 $\pm$ 1,8 ^{c,B}	-	15,8 $\pm$ 0,0 ^{ab,A}	8,8
320	60	16	44,2 $\pm$ 3,1 ^{abc,A}	17,2	23,0 $\pm$ 1,5 ^{bc,A}	28,6	23,2 $\pm$ 1,5 ^{b,B}	-	15,6 $\pm$ 0,6 ^{ab,A}	7,2

* Konsantrasyon değerleri ng/mL cinsinden ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Artış oranı yüzde olarak verilmiştir. Üst indis olarak kullanılan harfler (a-h) aynı ise örnekler arasında fark olmadığı; (x-z) aynı ise aynı sıcaklıktaki farklı işlem süreleri arasında fark olmadığı; (A-D) aynı ise aynı işlem sürelerinde farklı sıcaklıklar arasında fark olmadığı anlaşılmalıdır ($p>0,05$).

Kontrol grubunda valerik asit konsantrasyonu $0,0 \pm 0,0$ ng/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 4.17). 11 numaralı örneğin diğer örneklerden anlamlı derecede yüksek bir orana sahip olduğu görülmüştür ($p<0,05$). 45 dakika süre ile 246 μ m genlikte yapılan işlemin aynı sürede farklı genlikte yapılanlardan anlamlı derecede yüksek olduğu ($p<0,05$) ve aynı şekilde 60 dakika süre ile 246 μ m genlikte elde edilen oranın 98 μ m ve 172 μ m genlikteki uygulamalardan anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Kontrol grubunda hegzanoik asit konsantrasyonu $14,6 \pm 0,1$ ng/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 4.17). 3 numaralı örneğin konsantrasyon oranının anlamlı derecede diğer örneklerden yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$). 60 dakika süre ile farklı genliklerde yapılan işlemler arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$) ancak 45 dakika süre ile 98 μ m genlikte yapılmış olan uygulamanın 172 μ m ve 246 μ m genlikte yapılanlardan anlamlı derecede farklı olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Ultrases işlemi ile elde edilen postbiyotikler, *Lactocaseibacillus casei* kültürlerinde KZYA üretiminde farklı etkiler göstermiştir (Tablo 4.16, Tablo 4.17). Yüksek genlik (320 μ m) ve uzun süreli (60 dk) ultrases işlemleri, asetik asit ve propiyonik asit konsantrasyonlarında önemli artışlara yol açmıştır. Kim ve diğerleri (2022) çalışmasında, KZYA'ların ultrasonikasyon ile biyolojik örneklerde nasıl arttığını göstermiştir, bu bulgular bizim çalışmamızla uyumludur (Kim, Lee, Chae ve Cho, 2022).

Bütirik asit, izovalerik asit, valerik asit ve hegzanoik asit konsantrasyonları da artış göstermiştir. Özellikle 320 μ m genlik ve 60 dakika süreyle işlem gören örneklerde bütirik asit konsantrasyonları oranında artmıştır.

Kim ve diğerleri (2022), Bu çalışmada, biyolojik örneklerde KZYA'ların GC-MS ile analizi için geliştirilmiş bir yöntem sunulmuştur. Çalışma, KZYA'ların yüksek hassasiyetle ve doğrulukla ölçülmesini sağlamış, özellikle ultrasonikasyonun KZYA üretimini artırıcı etkilerini vurgulamıştır. Bu bulgular, bizim çalışmamızda ultrases ile elde edilen postbiyotiklerin KZYA üretimi üzerindeki olumlu etkilerini desteklemektedir.

4.3.4. Ultrasesle Üretilmiş Postbiyotiklerin *Bifidobacterium* Kültürü Ortamındaki KZYA Etkileri

Kontrol grubunda asetik asit konsantrasyonu $2678,5 \pm 127,8$ ng/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 4.18). Ultrases işlemi uygulamaları sonucunda, 6 ve 7 numaralı örneklerin kendi aralarında anlamlı bir farkları olmadığı ($p>0,05$) ancak diğer örneklerden anlamlı derecede yüksek oldukları görülmüştür ($p<0,05$). 98 μ m genlikte 60 dakika süre ile yapılan uygulamanın diğer sürelerdeki uygulamalardan ve 30 dakika süre ile uygulanan aynı genliğin 45 dakikadaki işleminden anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). 172 μ m genlikte ise 30 dakika süreyle işlem gören örneklerde asetik asit konsantrasyonlarının anlamlı derecede arttığı görülmüştür ($p<0,05$). 246 μ m genlikte 60 dakika ($p<0,05$) ve 320 μ m genlikte 60 dakika uygulamalarında ise diğer örneklerden anlamlı derecede düşük oldukları gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Aynı sürelerde farklı genliklerin etkisine bakıldığında, 45 dakika süresince genlik arttıkça konsantrasyon oranının da anlamlı derecede arttığı görülmüştür ($p<0,05$). 60 dakika süre ile uygulanan işlemlerde ise genlik arttıkça oranın anlamlı derecede düştüğü tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Kontrol grubunda propiyonik asit konsantrasyonu $14,6 \pm 0,4$ ng/mL olarak ölçülmüştür (Tablo 4.18). Ultrases işlem süreleri ve genlikleri arttıkça propiyonik asit konsantrasyonlarında anlamlı artışlar kaydedilmiştir. 8 numaralı örnek ile 6 numaralı örnek arasında anlamlı bir fark yakalanmamış olsa da ($p>0,05$) diğer örneklerden anlamlı derecede yüksek oldukları görülmüştür ($p<0,05$). 172 μ m genlikte 60 dakika süreyle işlem gören örneklerde propiyonik asit konsantrasyonlarının belirgin derecede aynı genlikteki diğer sürelerdeki işlemlere kıyasla arttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Aynı sürelerde farklı genliklerin etkisine bakıldığında, 60 dakika süresince 172 genlikte yapılan işlemlerin diğer genliklere kıyasla daha yüksek olduğu ($p<0,05$) ancak 45 dakika süre ile yapılan işlemlerdeki farklı genliklerden elde edilen konsantrasyon oranları arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Bu artışlar, ultrases işleminin propiyonik asit üretimi üzerinde önemli bir etkisi olduğunu ortaya koymaktadır.

Tablo 4.18 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak ultrases işlemi ile üretilen postbiyotiklerin ilavesi ile *Bifidobacterium* kültürü ortamında oluşan asetik, propiyonik ve izobütirik asitlerin değişimleri üzerindeki etkisi.*

Genlik (µm)	Süre (dk)	Örnek	Asetik Asit		Propiyonik Asit		İzobütirik Asit	
			Konsantrasyon	Oran	Konsantrasyon	Oran	Konsantrasyon	Oran
		Kontrol	2678,5 ± 127,8 ^a	-	14,6 ± 0,4 ^a	-	13,5 ± 0,2 ^a	-
98	30	2	3414,0 ± 4,8 ^{c,y}	27,5	15,0 ± 2,4 ^{a,x}	2,9	16,6 ± 0,5 ^{b,x}	22,7
	45	3	3222,1 ± 30,4 ^{b,x,A}	20,3	19,9 ± 2,5 ^{bc,x,A}	36,0	17,1 ± 0,3 ^{bc,x,B}	26,0
	60	4	3801,5 ± 77,8 ^{d,z,C}	41,9	17,6 ± 1,6 ^{ab,x,A}	20,4	19,2 ± 1,8 ^{cd,x,B}	41,7
172	30	6	5002,7 ± 131,9 ^{f,z}	86,8	21,6 ± 1,9 ^{cd,xy}	47,4	19,3 ± 1,6 ^{cd,y}	42,2
	45	7	3995,9 ± 47,5 ^{e,y,B}	49,2	18,3 ± 0,3 ^{abc,x,A}	24,8	14,0 ± 0,8 ^{a,x,A}	3,2
	60	8	3506,8 ± 99,7 ^{c,x,B}	30,9	23,5 ± 0,1 ^{d,y,B}	61,0	21,2 ± 1,2 ^{d,y,B}	56,7
246	45	11	4977,7 ± 57,8 ^{f,C}	85,8	15,6 ± 1,9 ^{a,A}	6,7	14,8 ± 0,2 ^{ab,A}	9,0
	60	12	3148,0 ± 9,9 ^{b,A}	17,5	17,5 ± 0,3 ^{ab,A}	19,4	15,3 ± 1,2 ^{ab,A}	12,9
320	60	16	3140,8 ± 11,2 ^{b,A}	17,3	17,1 ± 1,2 ^{ab,A}	16,6	15,0 ± 0,1 ^{ab,A}	10,6

* Konsantrasyon değerleri ng/mL cinsinden ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Artış oranı yüzde olarak verilmiştir. Üst indis olarak kullanılan harfler (a-h) aynı ise örnekler arasında fark olmadığı; (x-z) aynı ise aynı sıcaklıktaki farklı işlem süreleri arasında fark olmadığı; (A-D) aynı ise aynı işlem sürelerinde farklı sıcaklıklar arasında fark olmadığı anlaşılmaktadır (p>0,05).

Kontrol grubunda izobütirik asit konsantrasyonu $13,5 \pm 0,2$ ng/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 4.18). 4, 6 ve 8 numaralı örneklerin arasında anlamlı bir fark görülemedi (p>0,05) ancak 6 numaralı örneğin diğer örneklerden anlamlı derecede yüksek olduğu (p<0,05) ve izobütirik asit konsantrasyonlarının en yüksek değere ulaştığı görülmüştür (p<0,05). 172 µm genlikte 30 ve 60 dakika süreyle işlem gören örneğin 45 dakikaya göre anlamlı derecede yüksek oldukları gözlenmiştir (p<0,05). Aynı sürelerde farklı genliklerin etkisine bakıldığında, 45 dakika süre ile 98 µm genlikte uygulanan örneğin aynı sürede diğer genlikteki uygulamalara göre anlamlı derecede yüksek olduğu (p<0,05) ve 60 dakika süre ile 172 µm genlikte uygulanan işlemin 246 µm ve 320 µm genliklerdeki işlemlerden anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir (p<0,05). Bu sonuçlar, ultrases işleminin izobütirik asit üretimini de önemli derecede etkilediğini göstermektedir.

Kontrol grubunda bütirik asit konsantrasyonu $32,0 \pm 0,1$ ng/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 4.19). 4, 6 ve 7 numaralı örnekler arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0,05) ancak 6 numaralı örneğin bütirik asit konsantrasyonunun oranının diğer örneklerden anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür (p<0,05). 98 µm genlikte 60 dakika süre ile işlem yapılan örneğin anlamlı derecede 30 dakika süre ile işlem gören aynı genlikteki uygulamadan işlem gören örneğin oranından yüksek olduğu görülmüştür (p<0,05). 60 dakika süre ile 98 µm genlikteki işlemin aynı genlikteki diğer sürelerden anlamlı derecede yüksek olduğu (p<0,05) ancak 45 dakika süre ile gerçekleştirilen hiçbir genlikteki uygulama arasında anlamlı bir fark görülemedi (p>0,05).

Kontrol grubunda izovalerik asit konsantrasyonu $18,5 \pm 0,5$ ng/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 4.19). 6 ve 8 numaralı örneklerin konsantrasyon oranı arasında anlamlı bir fark yoktur (p>0,05) ancak bu örneklerin diğer örneklerden anlamlı derecede daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (p<0,05). 98 µm genlikte 60 dakika süre ile yapılan işlemin aynı genlikte 30 dakika süre ile yapılan uygulamadan anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür (p<0,05). 60 dakika süre ile 98 µm ve 172 µm genlikteki uygulamanın 246 µm ve 320 µm genlikteki uygulamadan anlamlı derecede yüksek olduğu (p<0,05) gözlemlenmiş ancak 45 dakika süre ile farklı genliklerde yapılan işlemlerin arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (p>0,05).

Tablo 4.19 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak ultrases işlemi ile üretilen postbiyotiklerin ilavesi ile *Bifidobacterium* kültürü ortamında oluşan bütirik, izovalerik, valerik ve hegzanoik asitlerin değişimleri üzerindeki etkisi.*

Genlik (μm)	Süre (dk)	Örnek	Bütirik Asit		İzovalerik Asit		Valerik Asit		Hegzanoik Asit	
			Konsantrasyon	Oran	Konsantrasyon	Oran	Konsantrasyon	Oran	Konsantrasyon	Oran
		Kontrol	32,0 $\pm$ 0,1 ^a	-	18,5 $\pm$ 0,5 ^a	-	0,0 $\pm$ 0,0 ^a	-	13,0 $\pm$ 0,6 ^a	-
98	30	2	34,3 $\pm$ 0,5 ^{ab,x}	7,2	20,0 $\pm$ 0,4 ^{ab,x}	8,2	0,0 $\pm$ 0,0 ^{a,x}	-	14,8 $\pm$ 0,2 ^{ab,x}	14,2
	45	3	38,6 $\pm$ 2,5 ^{abc,xy,A}	20,7	21,5 $\pm$ 1,7 ^{b,xy,A}	16,3	15,7 $\pm$ 0,6 ^{b,y,B}	-	19,1 $\pm$ 1,5 ^{d,y,A}	47,1
	60	4	45,1 $\pm$ 4,6 ^{cd,y,B}	41,0	24,8 $\pm$ 1,7 ^{c,y,B}	34,2	19,2 $\pm$ 1,0 ^{c,z,C}	-	15,8 $\pm$ 1,0 ^{b,x,A}	21,7
172	30	6	47,1 $\pm$ 1,8 ^{d,x}	47,0	27,6 $\pm$ 0,3 ^{d,y}	49,6	18,0 $\pm$ 0,3 ^{c,x}	-	20,0 $\pm$ 1,7 ^{d,x}	54,0
	45	7	41,6 $\pm$ 4,3 ^{cd,x,A}	29,8	21,0 $\pm$ 0,2 ^{b,x,A}	13,9	19,7 $\pm$ 1,7 ^{c,x,C}	-	18,8 $\pm$ 1,7 ^{cd,x,A}	45,0
	60	8	39,5 $\pm$ 1,2 ^{bc,x,AB}	23,3	26,3 $\pm$ 1,0 ^{cd,y,B}	42,5	18,7 $\pm$ 0,0 ^{c,x,C}	-	20,4 $\pm$ 1,1 ^{d,x,B}	57,1
246	45	11	39,9 $\pm$ 4,6 ^{bc,A}	24,7	18,5 $\pm$ 0,1 ^{a,A}	0,3	0,0 $\pm$ 0,0 ^{a,A}	-	16,0 $\pm$ 0,7 ^{b,A}	23,4
	60	12	32,4 $\pm$ 3,1 ^{a,A}	1,3	20,4 $\pm$ 0,1 ^{ab,A}	10,4	0,0 $\pm$ 0,0 ^{a,A}	-	16,5 $\pm$ 0,8 ^{bc,A}	27,0
320	60	16	34,2 $\pm$ 1,5 ^{ab,A}	6,8	21,0 $\pm$ 1,5 ^{b,A}	13,6	15,3 $\pm$ 1,5 ^{b,B}	-	15,6 $\pm$ 0,5 ^{b,A}	20,3

* Konsantrasyon değerleri ng/mL cinsinden ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Artış oranı yüzde olarak verilmiştir. Üst indis olarak kullanılan harfler (a-i) aynı ise örnekler arasında fark olmadığı; (x-z) aynı ise aynı sıcaklıktaki farklı işlem süreleri arasında fark olmadığı; (A-D) aynı ise aynı işlem sürelerinde farklı sıcaklıklar arasında fark olmadığı anlaşılmalıdır ($p>0,05$).

Kontrol grubunda valerik asit konsantrasyonu $0,0 \pm 0,0$ ng/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 4.19). 4, 6, 7 ve 8 numaralı örnekler arasında anlamlı bir fark görülememiştir ($p>0,05$) ancak bu örneklerin diğer örneklerden anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$). 98 μ m genlikte 60 dakika süre ile uygulanan işlemin aynı genlikteki diğer sürelerden anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$) ve işlem süre süresi azaldıkça konsantrasyonun da anlamlı derecede düştüğü gözlemlenmiştir ($p<0,05$). 45 dakika süre ile 172 μ m genlikte yapılan işlemin aynı sürede farklı genlikte yapılanlardan anlamlı derecede yüksek olduğu ($p<0,05$) ve aynı şekilde 60 dakika süre ile 172 μ m genlikte elde edilen oranın 246 μ m ve 320 μ m genlikteki uygulamalardan anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Kontrol grubunda hegzanoik asit konsantrasyonu $13,0 \pm 0,6$ ng/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 4.19). 3, 6, 7 ve 8 numaralı örnekler arasında anlamlı bir fark görülememiştir ($p>0,05$) ancak bu örneklerin konsantrasyon oranlarının diğerlerinden anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$). 98 μ m genlikteki 45 dakika süre ile yapılan işlemin aynı genlikteki diğer sürelerle kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$). 60 dakika süre ile 172 genlikte yapılan işlemin aynı sıcaklıkta farklı genliklerde yapılan uygulamalardan anlamlı derecede yüksek olduğu ($p<0,05$) ancak 45 dakika süre ile uygulanan hiçbir genlikte anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p>0,05$).

Ultrases işlemi ile elde edilen postbiyotiklerin *Bifidobacterium* kültürlerinde de önemli etkileri gözlenmiştir (Tablo 4.18, Tablo 4.19). Asetik asit, propiyonik asit ve izobütirik asit konsantrasyonları, özellikle 320 μ m genlik ve 60 dakika süreyle işlem gören örneklerde anlamlı derecede artmıştır. Bu bulgular, Chang ve diğerlerinin (2021) çalışmasında KZYA'ların biyolojik örneklerde hassas analizleri ile desteklenmektedir.

Bütirik asit, izovalerik asit, valerik asit ve hegzanoik asit konsantrasyonları da artış göstermiştir. Özellikle 320 μ m genlik ve 60 dakika süreyle işlem gören örneklerde bütirik asit konsantrasyonları artmıştır.

Chang ve diğerlerinin (2021), yaptıkları çalışmada, biyolojik örneklerde KZYA'ların GC-MS ile hassas analizi gerçekleştirilmiştir. Çalışma, KZYA'ların düşük konsantrasyonlarda bile doğru bir şekilde ölçülebilmesini sağlamış ve farklı işlem koşullarının KZYA üretimi üzerindeki etkilerini detaylandırmıştır. Bu bulgular, bizim çalışmamızla uyumludur.

Bu çalışmanın sonuçları, *Lactobacillus acidophilus* kullanılarak elde edilen postbiyotiklerin, farklı işlem koşullarına bağlı olarak *Lactocaseibacillus casei* ve *Bifidobacterium* kültürlerinde KZYA üretimini önemli derecede etkilediğini göstermektedir. Isıl işlem ve ultrases işlemleri, KZYA profillerini farklı şekillerde etkileyerek, bu bileşiklerin potansiyel sağlık yararlarını artırabilir. Ayrıca, KZYA'ların biyolojik örneklerde doğru ve hassas bir şekilde ölçülmesi, bu bileşiklerin sağlık üzerindeki potansiyel etkilerini anlamada kritik öneme sahiptir. Yao ve diğerleri (2022) ve Kim ve diğerleri (2022) tarafından geliştirilen GC-MS yöntemleri, bu alandaki araştırmalar için değerli araçlar sunmaktadır.

4.4. Postbiyotiklerin Patojenler Üzerine Etkisi

Postbiyotiklerin kolon mikrobiyotası üzerinde etkili olabilecek noktalarından bir tanesinin de gösterebilecekleri antimikrobiyal aktiviteleri olabileceği bilindiğinden, üretilecek olan postbiyotiklerin çeşitli patojen bakteriler üzerindeki potansiyel antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi planlanmıştır. Antimikrobiyal aktivite analizleri için patojen bakteriler olarak *Escherichia coli* ve *Enterococcus faecalis* seçilmiştir.

Isıl işlemle üretilmiş postbiyotiklerin (16 farklı koşulda *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak üretilen postbiyotikler) ve ultrases ile üretilmiş postbiyotiklerin (9 farklı koşulda *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak üretilen postbiyotikler) analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.4.1. Isıl İşleme Maruz Kalmış Postbiyotiklerin Patojenler Üzerine Etkileri

Postbiyotik üretiminde kullanılan probiyotiklerden birisi *Lactobacillus acidophilus* LA-5'tir ve çalışma kapsamındaki ısıl işlem ile üretimlerde denenen tüm koşullarda (16 işlem koşulu) postbiyotik üretilebilmiştir. İki farklı patojen mikroorganizma üzerindeki antimikrobiyal aktivitesinin incelendiği bu bölümün sonuçlarının ayrıntıları aşağıda paylaşılmıştır. Tablo 4.20'de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak üretilmiş postbiyotiklerin *Escherichia coli* üzerinde gösterdiği antimikrobiyal aktivite değerlendirilirken, Tablo 4.21'de *Enterococcus faecalis* üzerindeki antimikrobiyal etki verilmiştir.

65 °C'de yapılan işlemlerde, 30, 45, 60 ve 90 dakikalık sürelerde anlamlı farklar bulunmamaktadır ($p>0,05$). 45 dakikalık süredeki azalma oranı en yüksek değeri göstermekte,

90 dakikalık sürede ise azalma oranı en düşük değerdir. 30 dakika ile 60 dakika arasında fark yoktur ($p>0,05$), fakat 45 dakika ile 90 dakika arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

75 °C'de yapılan işlemlerde, 15, 30, 45 ve 60 dakikalık sürelerde anlamlı farklar bulunmamaktadır ($p>0,05$). Tüm sürelerdeki azalma oranları benzer düzeydedir. Ancak, 15 dakika ve 60 dakika süreleri arasında anlamlı fark yoktur ($p>0,05$).

85 °C'de yapılan işlemlerde, 10, 15, 30 ve 45 dakikalık sürelerde anlamlı farklar bulunmamaktadır ($p>0,05$). 30 dakikalık sürede en düşük azalma oranı gözlemlenmiştir. 10 dakika ile 45 dakika arasındaki fark anlamlı değildir ($p>0,05$).

95 °C'de yapılan işlemlerde, 5, 10, 15 ve 30 dakikalık sürelerde anlamlı farklar bulunmamaktadır ($p>0,05$). 15 dakikalık sürede en düşük azalma oranı gözlemlenmiştir. 5 dakika ile 30 dakika arasındaki fark anlamlı değildir ($p>0,05$).

Farklı sıcaklık ve sürelerde uygulanan ısı işlemleri, *Escherichia coli* üzerindeki antimikrobiyal aktiviteyi önemli ölçüde etkilemektedir. 30 dakika sürede, 65 °C'de azalma oranı en yüksek iken, 75 °C, 85 °C ve 95 °C'de daha düşük olarak gözlemlenmiştir. Bu farklar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). 45 dakika sürede, 65 °C'de azalma oranı en yüksek iken, 75 °C ve 85 °C'de daha düşük azalma oranları gözlemlenmiştir. Bu süre için de farklar anlamlıdır ($p<0,05$). 60 dakika sürede, 65 °C'de azalma oranı en yüksek iken, 75 °C ve 85 °C'de daha düşük azalma oranları gözlemlenmiştir ve bu farklar anlamlıdır ($p<0,05$).

65 °C'de yapılan ısı işlemlerinden elde edilen postbiyotiklerin antimikrobiyal aktivite üzerinde, diğer sıcaklıklara kıyasla en fazla etkiye sahip olduğu söylenebilir ve sıcaklık arttıkça azalma oranının, yani antimikrobiyal aktivitenin azaldığı Tablo 4.20'de görülmektedir. 75 ve 85 °C'de yapılan ısı işlemleri, daha düşük azalma oranları göstermiştir. Bu sıcaklık aralığında yapılan çalışmalar, ısı işlemin etkisinin sıcaklığa bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini ortaya koymuştur.

Tablo 4.20 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak kullanılarak ısıtılarak üretilen postbiyotiklerin *Escherichia coli*'ye karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivitenin sayısal sonuçları.*

Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Örnekler	Azalma Oranı (%)
65	30	1	13,23 ± 0,87 ^{g,xy,D}
	45	2	14,58 ± 0,83 ^{g,y,C}
	60	3	13,13 ± 0,40 ^{g,xy}
	90	4	11,09 ± 1,41 ^{f,x}
75	15	5	9,10 ± 0,75 ^{e,x,C}
	30	6	8,10 ± 1,20 ^{de,x,C}
	45	7	9,31 ± 0,51 ^{e,x,B}
	60	8	9,21 ± 0,28 ^{e,x}
85	10	9	7,73 ± 1,20 ^{de,y}
	15	10	6,97 ± 0,85 ^{d,xy,B}
	30	11	4,82 ± 0,33 ^{c,x,B}
	45	12	6,73 ± 0,43 ^{d,xy,A}
95	5	13	2,57 ± 0,72 ^{ab,xy}
	10	14	3,91 ± 0,99 ^{bc,y}
	15	15	1,46 ± 0,11 ^{a,x,A}
	30	16	2,02 ± 0,26 ^{a,x,A}

* Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Azalma oranı yüzde olarak verilmiştir. Üst indis olarak kullanılan harfler (a-g) aynı ise örnekler arasında fark olmadığı; (x-y) aynı ise aynı sıcaklıktaki farklı işlem süreleri arasında fark olmadığı; (A-D) aynı ise aynı işlem sürelerinde farklı sıcaklıklar arasında fark olmadığı anlaşılmalıdır (p>0,05).

95 °C'de yapılan ısıtma işlemleri, genellikle düşük azalma oranları göstermektedir. Özellikle 15 ve 20 dakika süreyle yapılan işlemlerde azalma oranları oldukça düşüktür. Bu bulgular, yüksek sıcaklıklarda yapılan uzun süreli ısıtma işlemlerinin, mikroorganizmaların dayanıklılık mekanizmalarını tetikleyerek antimikrobiyal etkinliği azaltabileceğini gösteren çalışmalarla uyumludur. Örneğin, Wen ve diğerleri (2022) tarafından yapılan bir çalışmada, yüksek sıcaklıklarda yapılan uzun süreli ısıtma işlemlerinin, mikroorganizmaların stres yanıtı mekanizmalarını aktive ederek hayatta kalma oranlarını artırdığı bildirilmiştir (Wen, Smelt, Vischer, De Vos, Setlow ve Brul, 2022).

Heniedy ve diğerkleri 2024, postbiyotiklerin antimikrobiyal özellikleri üzerindeki farklı işleme yöntemlerinin etkisini incelemiştir. Orta dereceli ısıt işlem (30-45 dakika 65°C gibi) içeren yöntemlerin antimikrobiyal bileşiklerin bütünlüğünü koruduğunu tespit etmişlerdir. Bu bulgular, 65°C'de optimal antimikrobiyal aktivite gözlemlediğimiz çalışmamızla paralellik göstermekte ve postbiyotik üretiminde termal işlemin önemini pekiştirmektedir (Heniedy, Mahdy, Elenien, Mourad ve El-Kadi, 2024).

Rahimi ve diğerkleri, postbiyotiklerin antimikrobiyal ve anti-inflamatuar özelliklerine odaklanmıştır. Orta dereceli termal işleminin patojenlere karşı postbiyotik etkinliğini artırırken biyoaktif bileşenleri koruduğunu bildirmişlerdir. Bulgularımız, özellikle 65°C ve 75°C'de gözlemlenen önemli azalma oranları açısından bu bulgularla uyumludur ve kontrollü ısıt işleminin antimikrobiyal özellikleri korumanın anahtarı olduğunu desteklemektedir (Rahimi, Sadeghi, Kashaninejad ve Ebrahimi, 2024).

65 °C'de yapılan işlemler arasında 30, 45, 60 ve 90 dakikalık sürelerde anlamlı farklar bulunmamaktadır ($p>0,05$). 60 dakikalık sürede azalma oranı en yüksek seviyedeysen, 90 dakikalık sürede azalma oranı en düşük seviyededir. 30 dakika ile 60 dakika arasında fark yoktur ($p>0,05$), fakat 45 dakika ile 90 dakika arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

75 °C'de yapılan işlemlerde de 15, 30, 45 ve 60 dakikalık sürelerde anlamlı farklar bulunmamaktadır ($p>0,05$). Tüm sürelerdeki azalma oranları benzer düzeydedir. Ancak, 15 dakika ile 60 dakika süreleri arasında anlamlı fark yoktur ($p>0,05$).

85 °C'de yapılan işlemler arasında 10, 15, 30 ve 45 dakikalık sürelerde anlamlı farklar bulunmamaktadır ($p>0,05$). 10 dakikalık sürede azalma oranı en düşük seviyededir. 10 dakika ile 45 dakika arasındaki fark anlamlı değildir ($p>0,05$).

95 °C'de yapılan işlemler arasında 5, 10, 15 ve 30 dakikalık sürelerde anlamlı farklar bulunmamaktadır ($p>0,05$). 10 dakikalık sürede azalma oranı en düşük seviyededir. 5 dakika ile 30 dakika arasındaki fark anlamlı değildir ($p>0,05$).

Tablo 4.21 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak kullanılarak ısıtılarak üretilen postbiyotiklerin *Enterococcus faecalis*'e karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivitenin sayısal sonuçları.*

Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Örnekler	Azalma Oranı (%)
65	30	1	6,46 ± 0,69 ^{e,x,C}
	45	2	7,43 ± 2,87 ^{e,x,B}
	60	3	8,37 ± 1,98 ^{e,x}
	90	4	3,77 ± 1,70 ^{e,x}
75	15	5	5,33 ± 1,55 ^{e,x,C}
	30	6	4,92 ± 0,78 ^{e,x,C}
	45	7	3,90 ± 1,52 ^{e,x,B}
	60	8	2,39 ± 1,20 ^{e,x}
85	10	9	-9,46 ± 1,75 ^{cd,x}
	15	10	-3,91 ± 0,80 ^{d,y,B}
	30	11	-6,33 ± 0,86 ^{cd,xy,B}
	45	12	-5,45 ± 1,38 ^{cd,y,A}
95	5	13	-17,74 ± 3,63 ^{b,xy}
	10	14	-27,39 ± 7,07 ^{a,x}
	15	15	-10,39 ± 2,39 ^{c,y,A}
	30	16	-10,65 ± 2,75 ^{c,y,A}

* Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Azalma oranı yüzde olarak verilmiştir. Üst indis olarak kullanılan harfler (a-d) aynı ise örnekler arasında fark olmadığı; (x-y) aynı ise aynı sıcaklıktaki farklı işlem süreleri arasında fark olmadığı; (A-C) aynı ise aynı işlem sürelerinde farklı sıcaklıklar arasında fark olmadığı anlaşılmalıdır (p>0,05).

Farklı sıcaklık ve sürelerde uygulanan ısıtma işlemleri, *Enterococcus faecalis* üzerindeki antimikrobiyal aktiviteyi önemli ölçüde etkilemektedir. 30 dakika sürede, 65 °C'de azalma oranı en yüksek iken, 85 °C ve 95 °C'de daha düşük azalma oranları gözlemlenmiştir. Bu farklar istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05). 45 dakika sürede, 65 °C'de azalma oranı en yüksek iken, 75 °C ve 85 °C'de daha düşük azalma oranları gözlemlenmiştir ve bu farklar da anlamlıdır (p<0,05). 60 dakika sürede, 65 °C'de azalma oranı en yüksek iken, 75 °C ve 85 °C'de daha düşük azalma oranları gözlemlenmiştir ve bu farklar da anlamlıdır (p<0,05).

Bu tabloda da *E. coli*'deki (Tablo 4.20) gibi düşük sıcaklıklarda azalma oranlarının daha yüksek olduğu görülmüştür. Aynı şekilde sıcaklığın artması ile birlikte antimikrobiyal aktivitenin de azaldığı yorumu yapılabilir.

Chang ve diğerleri (2021), postbiyotiklerin antimikrobiyal özelliklerini araştırmışlar ve ısı ile öldürülmüş bakterilerin antimikrobiyal etkilerde önemli olduğunu vurgulamışlardır. Bizim sonuçlarımız, özellikle 65°C ve 75°C'de yüksek antimikrobiyal aktivite gösteren bulguları desteklemektedir. Ancak, 85°C ve 95°C'de gözlemlenen düşük etkinlik, yüksek sıcaklıkların antimikrobiyal bileşiklerin bozulmasına neden olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışma, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak ısıl işlemle üretilen postbiyotiklerin *Enterococcus faecalis* üzerindeki antimikrobiyal aktivitesini detaylı bir şekilde incelemiştir. Sonuçlar, düşük sıcaklıklarda belirli bir antimikrobiyal aktivite olduğunu, ancak sıcaklık arttıkça bu etkinin azaldığını veya tersine döndüğünü göstermektedir. Literatürdeki diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında, elde edilen sonuçlar genel eğilimlerle uyumlu olup, postbiyotiklerin potansiyel antimikrobiyal ajanlar olarak kullanımının koşullara bağlı olduğunu ortaya koymaktadır.

Antimikrobiyal aktivite karşılaştırmasında düşük sıcaklıkta (65 °C) yapılan ısıl işlemde *E. coli* üzerinde bir azalma sağlanmıştır. Bu, postbiyotiklerin düşük sıcaklıkta bile belirli bir antimikrobiyal etki gösterebildiğini işaret etmektedir. *E. faecalis* üzerinde de azalma sağlanmıştır ancak *E. coli* kadar etkin değildir. Bu, *E. coli*'ye göre daha düşük bir antimikrobiyal etki olduğunu göstermektedir. Orta sıcaklıkta (75 °C) yapılan ısıl işlemde *E. coli* üzerinde azalma sağlanmıştır. Aynı sıcaklık *E. faecalis* üzerinde de azalma sağlamıştır ancak *E. coli*'ye kıyasla bu azalma oranı daha düşüktür. Yüksek sıcaklıkta (85 °C ve 95 °C) yapılan ısıl işlemde *E. coli* üzerinde azalma sağlanmıştır ancak *E. faecalis* üzerinde ise pozitif değerler yani bir artış görülmüştür. Bu, yüksek sıcaklıkların *E. faecalis* üzerinde negatif bir etki yarattığını ve büyümeyi teşvik ettiğini göstermektedir.

E. coli üzerinde ısıl işlemle üretilen postbiyotiklerin antimikrobiyal etkisi, özellikle düşük ve orta sıcaklıklarda belirgin olmuştur. Isıl işlemin mikroorganizmalar üzerinde genellikle öldürücü bir etkisi olduğunu ve postbiyotiklerin fermentasyon ürünlerinin patojenlere karşı etkili olabileceğini göstermektedir. *E. faecalis* üzerinde ise ısıl işlemle üretilen

postbiyotiklerin antimikrobiyal etkisi, düşük sıcaklıklarda belirginken, yüksek sıcaklıklarda büyüme teşvik edilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak ısıtılma işlemle üretilen postbiyotiklerin *E. coli* ve *E. faecalis* üzerindeki farklı antimikrobiyal etkilerini ortaya koymaktadır. Düşük ve orta sıcaklıklarda antimikrobiyal aktivite gözlemlenirken, yüksek sıcaklıklarda *E. faecalis* üzerinde olumsuz etkiler (büyüme) ortaya çıkmıştır.

4.4.2. Ultrasese Maruz Kalmış Postbiyotiklerin Patojenler Üzerine Etkileri

Tablo 4.22, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak ultrases ile üretilen postbiyotiklerin *Escherichia coli* (*E. coli*) üzerindeki antimikrobiyal aktivitesini göstermektedir. Tabloda, farklı genlik (μm) ve süre (dk) kombinasyonlarına bağlı olarak postbiyotiklerin *E. coli* üzerindeki azalma oranları (%) belirtilmiştir. Verilere göre, ultrases uygulamasının *E. coli* üzerindeki etkisi oldukça sınırlıdır ve bazı genlik/süre kombinasyonlarında bakteriyel büyümeyi teşvik edebilecek sonuçlar gözlenmiştir.

98 μm genlikte, 30 dakikalık süre ile 45 ve 60 dakikalık süreler arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). Ancak, genlik ve süre arttıkça azalma oranında bir artış gözlemlenmiştir. 30 dakika uygulanan ultrases sonucu ile 45 ve 60 dakikalık işlemler arasında anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$), ancak 60 dakikalık süredeki azalma oranı 30 dakikaya göre daha yüksektir ve bu fark anlamlıdır ($p<0,05$). Aynı şekilde, 45 dakika ve 60 dakika arasındaki fark da anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

172 μm genlikte, 30, 45 ve 60 dakikalık işlemler arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). 30 dakika uygulanan ultrases sonucu ile 45 ve 60 dakikalık işlemler arasında anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$). Bu genlikteki her üç süre arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Tablo 4.22 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak kullanılarak ultrases ile üretilen postbiyotiklerin *Escherichia coli*'e karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivitenin sayısal sonuçları.*

Genlik (µm)	Süre (dk)	Örnekler	Azalma Oranı (%)
98	30	2	4,12 ± 0,05 ^{a,x}
	45	3	5,02 ± 0,17 ^{ab,xy,A}
	60	4	6,54 ± 1,14 ^{c,y,A}
172	30	6	5,31 ± 0,59 ^{abc,x}
	45	7	6,02 ± 0,72 ^{bc,x,A}
	60	8	6,62 ± 0,70 ^{c,x,A}
246	45	11	6,12 ± 0,29 ^{bc,A}
	60	12	10,04 ± 0,06 ^{d,B}
320	60	16	5,62 ± 0,13 ^{bc,A}

* Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Azalma oranı yüzde olarak verilmiştir. Üst indis olarak kullanılan harfler (a-d) aynı ise farklı örnekler arasında fark olmadığı, (x-y) aynı ise aynı genlikteki farklı işlem süreleri arasında fark olmadığı, (A-B) aynı ise aynı işlem sürelerinde farklı genlikler arasında fark olmadığı anlaşılmalıdır (p>0,05).

246 µm genlikte, 45 ve 60 dakikalık işlemler arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır (p>0,05). 45 dakika uygulanan ultrases sonucu ile 60 dakikalık işlem süresinde belirgin şekilde daha yüksek bir azalma oranı sağlanmıştır, ancak bu süreler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.

320 µm genlikte sadece 60 dakikalık işlem süresi uygulanmış olup, bu süre içinde gözlemlenen azalma oranı diğer genlik ve süreler ile kıyaslandığında 98 µm ve 172 µm genliklerdeki 60 dakika süreler ile benzer olup, anlamlı bir fark göstermemektedir (p>0,05).

30 dakika sürede, 98 µm genlik en düşük değeri gösterirken, 172 µm genlik daha yüksek bir değer göstermiştir. Bu süre içerisinde farklı genlikler arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır (p<0,05).

45 dakika sürede, 98 µm genlik belirli bir azalma oranı gösterirken, 172 µm genlik ve 246 µm genlik daha yüksek azalma oranları göstermiştir. Bu genlikler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (p<0,05).

60 dakika sürede, 98 µm genlik belirli bir azalma oranı gösterirken, 172 µm genlik ve 246 µm genlik daha yüksek azalma oranları göstermiştir. 246 µm genlikteki azalma oranı, diğer iki genlikteki değerlerden anlamlı derecede farklıdır (p>0,05). 320 µm genlikte ise azalma oranı diğer genliklerle anlamlı bir fark göstermemektedir (p<0,05).

Genel olarak, genlik ve süreler arttıkça azalma oranlarında artış gözlemlenmiştir. Ancak, her genlik ve süre kombinasyonu arasında anlamlı farklar bulunmamaktadır. 98 µm genlikte 30 dakika süre ile 60 dakika süre arasında, 246 µm genlikte ise 45 dakika süre ile 60 dakika süre arasında anlamlı farklar bulunmuştur ($p<0,05$).

Bu çalışmanın sonuçları, farklı genlik ve sürelerde uygulanan ultrases işlemlerinin *E. coli* üzerindeki antimikrobiyal aktiviteyi önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir. Özellikle, daha yüksek genliklerde (246 µm) ve belirli sürelerde (60 dakika) daha yüksek azalma oranları gözlemlenmiştir.

Gao ve diğerleri (2014), ultrasonik dalgaların mikroorganizmalar üzerinde hücresel bozulmaya neden olabileceğini ve hücre zarını parçalayıcı etkileri olduğunu belirtmiştir. Ancak, bu etkinin genlik ve süreye bağlı olarak büyük ölçüde değişebileceğini vurgulamışlardır. Tablo 4.14'te görülen düşük azalma oranları, muhtemelen bu çalışmadaki genlik ve süre kombinasyonlarının *E. coli* üzerinde yeterince yüksek bir stres oluşturmadığını göstermektedir. Piyasena ve diğerleri (2003), ultrasesin mikroorganizmalar üzerindeki etkisinin genellikle daha yüksek genliklerde ve uzun sürelerde belirgin olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmada kullanılan genlikler ve süreler muhtemelen yetersiz kalmış ve bu yüzden *E. coli* üzerinde minimal veya negatif etkiler gözlenmiştir.

Valero ve diğerleri (2007), sıvı gıdalarda ultrasesin antimikrobiyal etkisini incelemiş ve özellikle *E. coli* gibi gram-negatif bakterilere karşı yüksek genlik ve sürelerde etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada, daha düşük genlik ve sürelerin etkisiz kaldığı veya bakteriyel büyümeyi teşvik edici etkiler gösterdiği görülmüştür.

Tablo 4.22'deki veriler, ultrases ile üretilen postbiyotiklerin *E. coli* üzerindeki antimikrobiyal etkisinin genlik ve süreye bağlı olarak değiştiğini göstermektedir. Genellikle düşük genlik ve süre kombinasyonlarının *E. coli* üzerinde minimal veya negatif etkileri olduğu gözlenmiştir. Literatürdeki diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında, bu parametrelerin optimize edilmediği ve dolayısıyla etkisiz kaldığı anlaşılmaktadır. Ultrasesin etkili bir antimikrobiyal ajan olarak kullanılması için genlik ve süre kombinasyonlarının dikkatlice seçilmesi gerektiği sonucuna varılmaktadır.

Tablo 4.23 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak kullanılarak ultrases ile üretilen postbiyotiklerin *Enterococcus faecalis*'e karşı gösterdiği antimikrobiyal aktivitenin sayısal sonuçları.*

Genlik (µm)	Süre (dk)	Örnekler	Azalma Oranı (%)
98	30	2	1,10 ± 0,37 ^{a,x}
	45	3	2,61 ± 0,39 ^{bc,x,AB}
	60	4	2,62 ± 1,34 ^{bc,x,AB}
172	30	6	3,71 ± 0,04 ^{c,x}
	45	7	3,96 ± 0,79 ^{c,x,B}
	60	8	3,20 ± 0,03 ^{c,x,B}
246	45	11	1,27 ± 0,37 ^{ab,A}
	60	12	1,69 ± 0,26 ^{ab,AB}
320	60	16	0,93 ± 0,37 ^{a,A}

* Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Azalma oranı yüzde olarak verilmiştir. Üst indis olarak kullanılan harfler (a-d) aynı ise farklı örnekler arasında fark olmadığı, (x-y) aynı ise aynı genlikteki farklı işlem süreleri arasında fark olmadığı, (A-B) aynı ise aynı işlem sürelerinde farklı genlikler arasında fark olmadığı anlaşılmalıdır (p>0,05).

Lactobacillus acidophilus LA-5 kullanılarak ultrases ile üretilen postbiyotiklerin, *Enterococcus faecalis* üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Tablo 4.23, farklı genlik ve sürelerde uygulanan ultrases işlemlerinin *E. faecalis* üzerindeki azaltma oranlarını göstermektedir. Değerler, ultrases işlemlerinin *E. faecalis*'in büyümesini ne kadar inhibe ettiğini yansıtmakta ve yüzdelik azalım oranları olarak ifade edilmektedir.

98 µm genlikte, 30 dakikalık süre ile 45 ve 60 dakikalık süreler arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır (p>0,05). Ancak, genlik ve süre arttıkça azalma oranında bir artış gözlemlenmiştir. 30 dakika uygulanan ultrases sonucu ile 45 ve 60 dakikalık işlemler arasında anlamlı bir fark yoktur (p>0,05), ancak 45 dakika ve 60 dakika arasındaki fark anlamlı değildir (p>0,05).

172 µm genlikte, 30, 45 ve 60 dakikalık işlemler arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır (p>0,05). 30 dakika uygulanan ultrases sonucu ile 45 ve 60 dakikalık işlemler arasında anlamlı bir fark yoktur (p>0,05). Bu genlikteki her üç süre arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı değildir (p>0,05).

246 µm genlikte, 45 ve 60 dakikalık işlemler arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır (p>0,05). 45 dakika uygulanan ultrases sonucu ile 60 dakikalık işlem süresinde belirgin

şekilde daha yüksek bir azalma oranı sağlanmıştır, ancak bu süreler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

320 µm genlikte sadece 60 dakikalık işlem süresi uygulanmış olup, bu süre içinde gözlemlenen azalma oranı diğer genlik ve süreler ile kıyaslandığında 98 µm ve 172 µm genliklerdeki 60 dakika süreler ile benzer olup, anlamlı bir fark göstermemektedir ($p>0,05$).

Genel olarak, genlik ve süreler arttıkça azalma oranlarında artış gözlemlenmiştir. Ancak, her genlik ve süre kombinasyonu arasında anlamlı farklar bulunmamaktadır. 98 µm genlikte 30 dakika süre ile 45 dakika süre arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$).

Aynı süre farklı genliklerdeki örnekler de kıyaslandığında, 30 dakika sürede, 98 µm genlik en düşük değeri gösterirken, 172 µm genlik daha yüksek bir değer göstermiştir. Bu süre içerisinde farklı genlikler arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). 45 dakika sürede, 98 µm genlik belirli bir azalma oranı gösterirken, 172 µm genlik daha yüksek azalma oranları göstermiştir. Bu genlikler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). 60 dakika sürede, 98 µm genlik belirli bir azalma oranı gösterirken, 172 µm genlik ve 246 µm genlik daha yüksek azalma oranları göstermiştir. 246 µm genlikteki azalma oranı, diğer iki genlikteki değerlerden anlamlı derecede farklı değildir ($p>0,05$). 320 µm genlikte ise azalma oranı diğer genliklerle anlamlı bir fark göstermemektedir ($p>0,05$).

98 µm genlikte yapılan işlemlerde azalma oranlarının çok düşük olması, ultrasesin düşük genliklerde ve kısa süreli işlemlerde etkili olmadığını göstermektedir. Daha yüksek genlikte (320 µm) yapılan işlemlerde bile azalma oranının düşük olması, *E. faecalis* üzerinde ultrasesin sınırlı bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Rahimi ve diğerleri (2024) tarafından *Saccharomyces cerevisiae*'nin postbiyotik karakterizasyonu üzerine yapılan çalışmalarda antimikrobiyal etkilerle uyumludur. Her iki çalışmada da antimikrobiyal etkinlik, belirli işlem koşullarına bağlı olarak değişiklik göstermiştir ve optimal parametrelerin belirlenmesinin postbiyotik üretiminde kritik öneme sahip olduğu vurgulanmıştır.

Joyce ve diğerleri (2003) tarafından yapılan bir çalışmada, ultrases işleminin patojenler üzerindeki antimikrobiyal etkisinin genlik ve süreye bağlı olarak değiştiği ve düşük

genliklerde etkisinin sınırlı olduğu belirtilmiştir. Aynı şekilde, Ultrases işleminin yüksek genliklerde ve uzun sürelerde daha etkili olduğu, ancak bu koşullarda bile etkisinin tam anlamıyla yeterli olmadığı vurgulanmıştır (Joyce, Al-Hashimi ve Mason, 2003).

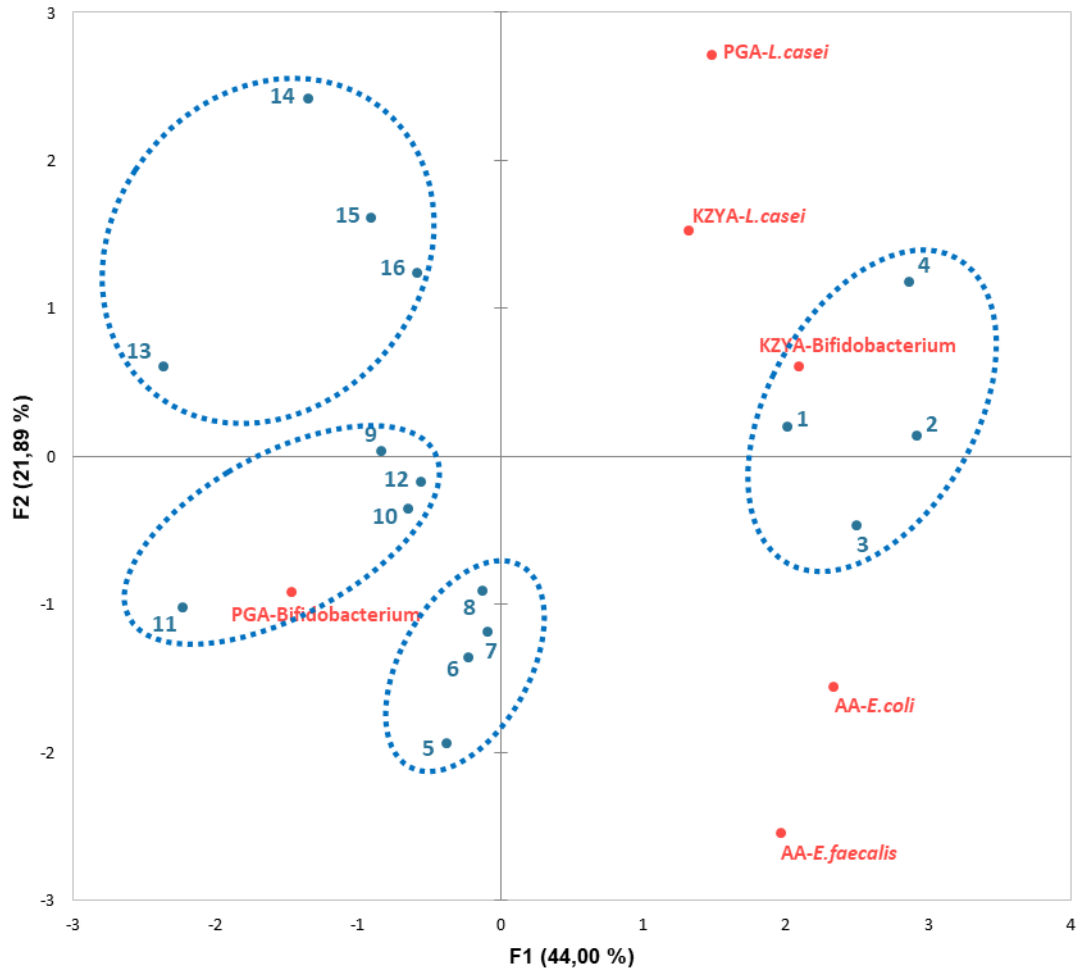
Sonuç olarak, bu çalışma, ultrases işlemiyle üretilen postbiyotiklerin *E. faecalis* üzerinde etkili olmadığını göstermektedir. Bu bulgular, ultrases işleminin antimikrobiyal etkisinin genlik ve süreye bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini ve bazı mikroorganizmalar üzerinde etkisiz olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, postbiyotik üretiminde ultrases işleminin etkinliği hedef mikroorganizmaya ve uygulama parametrelerine göre değerlendirilmelidir.

Bu iki tablo karşılaştırıldığında, her iki bakterinin de ultrases ile üretilen postbiyotiklere karşı benzer tepkiler verdiği görülmektedir. Hem *E. faecalis* hem de *E. coli*, düşük genlik ve sürelerde minimal veya negatif azalma oranları göstermektedir. Bununla birlikte, her iki bakterinin de genlik ve süreye bağlı olarak farklı tepkiler verebileceği, bu yüzden optimizasyonun önem arz ettiği anlaşılmaktadır.

4.5. Sonuçların Toplu Değerlendirmesi

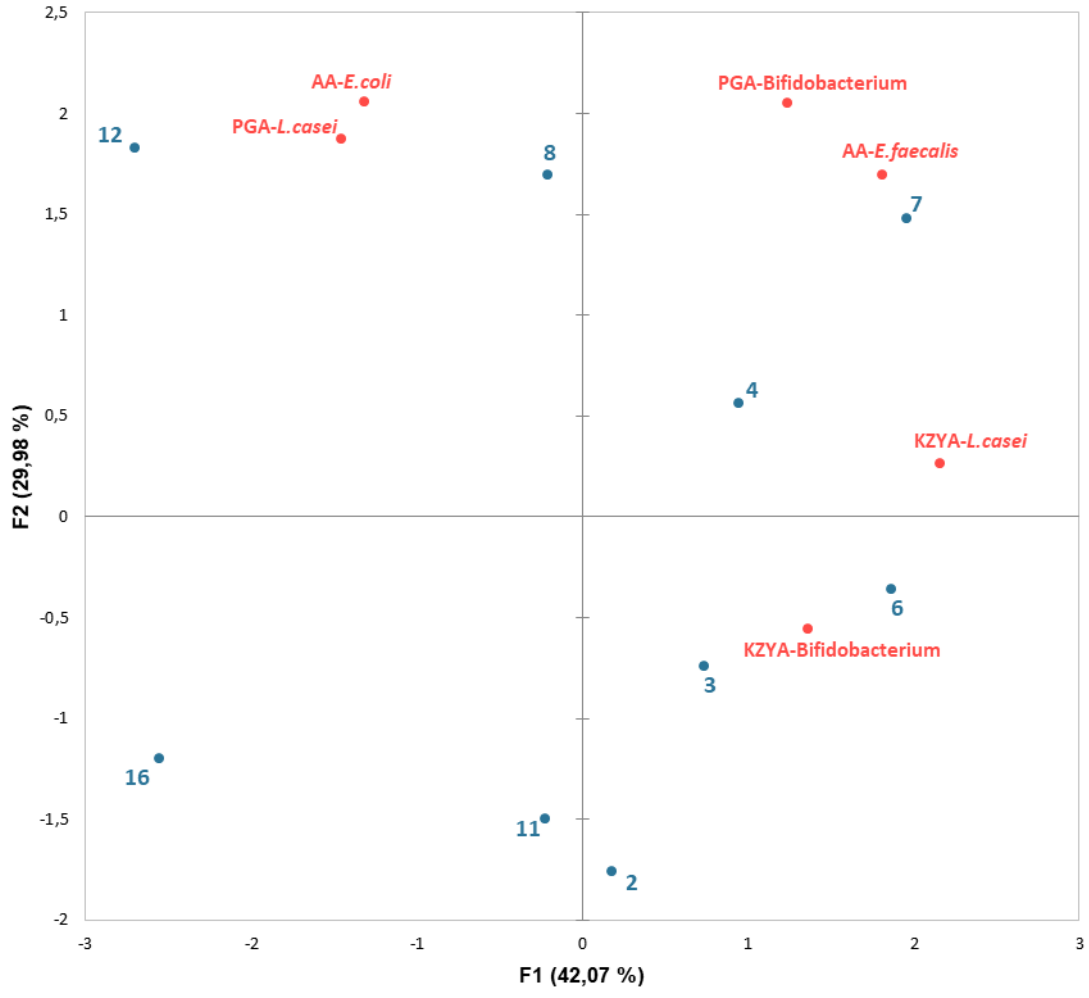
Farklı işleme yöntemleri ile farklı koşullarda üretilmiş olan postbiyotiklerin analizlerinin toplu olarak değerlendirilebilmesinde TBA kullanılmıştır. Isıl işlemle üretilen postbiyotiklerin ve ultrases işleme ile üretilen postbiyotiklerin değerlendirilmesinde ayrı ayrı TBA'dan yararlanılmıştır.

Isıl işlemle üretilen postbiyotiklerin değerlendirilmesi için yapılan TBA sonucunda, çalışmada kullanılan değişkenler tarafından oluşan ve en yüksek varyasyona sahip iki faktörden birisinin toplam değişimi %44,0 diğerinin ise %21,9 oranında açıkladığı belirlenmiştir. Bu iki faktörün kullanımı ile elde edilen ve toplam değişimin %65,9'unu açıklayan dağılım grafiği Şekil 4.1'de verilmiştir. Buna göre, her bir sıcaklık için üretilen postbiyotiklerin 4 ayrı grupta toparlanabildiği görülmektedir. Özellikle 75 °C'de üretilen örneklerin x eksenini boyunca birbirine çok yakın bir pozisyonda konumlandığı ve kısmen y eksenini boyunca ayrıldığı görülmektedir. Buna karşın, 65 °C'de üretilen örneklerin x ekseninin pozitif yarısında biriktiği ve bu anlamda temel ayırıcı faktöre göre diğer tüm örneklerden ayrıştığı görülmüştür.



Şekil 4.1 ısıtma işlemiyle üretilen postbiyotiklerin analiz edilen özellikleri için TBA biplot grafiği (AA: antimikrobiyal aktivite; KZYA: kısa zincirli yağ asidi; PGA: probiyotik geliştirici aktivite).

Ultras ses işleme ile üretilen postbiyotiklerin değerlendirilmesi için yapılan TBA sonucunda ise, çalışmada kullanılan değişkenler tarafından oluşan ve en yüksek varyasyona sahip iki faktörden birisinin toplam değişimi %42,1 diğerinin ise %30,0 oranında açıkladığı belirlenmiştir. Bu iki faktörün kullanımı ile elde edilen ve toplam değişimin %72,1'ini açıklayan dağılım grafiği Şekil 4.2'de verilmiştir. Buna göre, ultras ses ile üretilen postbiyotiklerde, ısıtma işlemiyle üretilen örneklerdeki kadar belirgin grupların oluşmadığı görülmüştür. Buna karşın genel anlamda yüksek genlikte ultras ses ile üretilen postbiyotiklerin x ekseninin negatif tarafında biriktiği, ancak bu örnekler arasında da süre ile y eksenini boyunca önemli farklılıkların oluştuğu görülmektedir.



Şekil 4.2 Ultrases işleme ile üretilen postbiyotiklerin analiz edilen özellikleri için TBP biplot grafiği (AA: antimikrobiyal aktivite; KZYA: kısa zincirli yağ asidi; PGA: probiyotik geliştirici aktivite).

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada, probiyotik mikroorganizmaların ısıtma işlem ve ultrases yöntemleriyle inaktive edilmesinin, postbiyotik üretimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, tez çalışması kapsamında ısıtma işlemle çalışılan tüm deneysel koşullarda probiyotiklerin tamamen inaktive edildiğini ve ultrases yönteminin de probiyotiklerin inaktivasyonunda kullanılabildiğini göstermiştir.

Isıtma işlem ve ultrases yöntemleri yardımıyla inaktive edilen *Lactobacillus acidophilus*'tan elde edilen postbiyotiklerin probiyotikler üzerindeki geliştirici aktiviteleri analiz edilmiştir. Isıtma işlem yöntemi ile inaktive edilmiş olan postbiyotiklerin, ultrases ile inaktive edilenlere göre probiyotik geliştirici aktivite etkinliğinin daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Isıtma işlem ile inaktive edilmiş postbiyotiklerin, *L. casei* üzerindeki probiyotik geliştirici aktivitesinin, *Bifidobacterium* kültürü ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ultrases ile üretilen postbiyotiklerin probiyotikler üzerindeki etkilerine bakıldığında ise *L. casei* ve *Bifidobacterium* kültürünün neredeyse aynı oranda artış gösterdiği ve çoğu örneğin azaldığı görülmüştür.

Postbiyotiklerin patojenlere karşı antimikrobiyal etkisi, sıcaklık ve süreyle ilgili olarak değişiklik göstermiştir. Hem ısıtma işlem ile hem de ultrases ile elde edilmiş olan postbiyotiklerin *E. coli* ve *E. faecalis*'i inhibe edebildiği görülmüştür. Ancak, ısıtma işlem ile yüksek sıcaklık ve uzun sürelerde üretilmiş olan postbiyotiklerin *E. faecalis*'in gelişmesine neden olabildiği gözlemlenmiştir. Genel olarak ısıtma işlem ile düşük sıcaklık ve düşük sürelerde inaktive edilen postbiyotiklerin antimikrobiyal etkinliğinin, hem *E. coli* hem de *E. faecalis* üzerinde, yüksek sıcaklık ve yüksek sürelerde üretilmiş olan postbiyotiklere göre daha fazla olduğu, sıcaklığın ve sürenin artması ile antimikrobiyal aktivitenin azalış gösterdiği tespit edilmiştir. Ultrases ile elde edilen postbiyotiklerin hem *E. coli* hem de *E. faecalis* üzerinde birbirine yakın düzeylerde antimikrobiyal aktivite gösterdiği görülmüştür.

Hem ısıtma işlem hem de ultrases inaktivasyon yöntemleri ile üretilen postbiyotiklerin probiyotik ortamına ilave edilmesi durumunda, KZYA'ların miktarında artışa neden olduğu belirlenmiştir. Ancak, ultrases ile 246 µm ve 320 µm genliklerde elde edilmiş olan

postbiyotiğin *L. casei* ortamında oluşan KZYA'ların genel olarak artmasını neden olurken, sadece asetik asitte azalmanın gerçekleştiği tespit edilmiştir.



KAYNAKÇA

Aguilar-Toalá, J., Garcia-Varela, R., Garcia, H., Mata-Haro, V., González-Córdova, A., Vallejo-Cordoba, B., ve Hernández-Mendoza, A. (2018). Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science ve Technology*, 75, 105–114.

Allen, A. P., Hutch, W., Borre, Y. E., Kennedy, P. J., Temko, A., Boylan, G., . . . Clarke, G. (2016). *Bifidobacterium longum* 1714 as a translational psychobiotic: modulation of stress, electrophysiology and neurocognition in healthy volunteers. *Translational Psychiatry*, 6(11), e939.

Almada, C. N., Almada-Érix, C. N., Costa, W. K. A., Graça, J. S., Cabral, L., Noronha, M. F., . . . Sant’Ana, A. S. (2021). Wheat-durum pasta added of inactivated *Bifidobacterium animalis* decreases glucose and total cholesterol levels and modulates gut microbiota in healthy rats. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 72(6), 781–793.

Amaretti, A., Di Nunzio, M., Pompei, A., Raimondi, S., Rossi, M., ve Bordoni, A. (2013). Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: in vitro and in vivo activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(2), 809–817.

Arias, C. A., ve Murray, B. E. (2012). The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews. Microbiology*, 10(4), 266–278.

Atlas, R. M. (2010). *Handbook of Microbiological Media*. CRC Press eBooks.

Barros, C. P., Guimarães, J. T., Esmerino, E. A., Duarte, M. C. K., Silva, M. C., Silva, R., . . . Cruz, A. G. (2020). Paraprobiotics and postbiotics: concepts and potential applications in dairy products. *Current Opinion in Food Science*, 32, 1–8.

Barros, C. P., Pires, R. P., Guimarães, J. T., Abud, Y. K., Almada, C. N., Pimentel, T. C., . . . Cruz, A. G. (2021). Ohmic heating as a method of obtaining paraprobiotics: Impacts on cell structure and viability by flow cytometry. *Food Research International*, 140, 110061.

Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorrente, C., ve Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition ve Metabolism*, 61(2), 160–174.

Bernet, M. F., Brassart, D., Neeser, J. R., ve Servin, A. L. (1994). *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut*, 35(4), 483–489.

Besten, G. D., Van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D. J., ve Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*, 54(9), 2325–2340.

Birmpa, A., Sfika, V., ve Vantarakis, A. (2013). Ultraviolet light and Ultrasound as non-thermal treatments for the inactivation of microorganisms in fresh ready-to-eat foods. *International Journal of Food Microbiology*, 167(1), 96–102.

Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., . . . Shao, Y. (1997). The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277(5331), 1453–1462.

Butz, P., ve Tauscher, B. (2002). Emerging technologies: chemical aspects. *Food Research International*, 35(2–3), 279–284.

Cebeci, B. K., ve Mankan, E. (2022). COVID-19 Pandemi Sürecinde Tüketicilerin Fonksiyonel Gıdalara Yönelik Tutumları. *Journal of Humanities and Tourism Research*, 12(2), 405-416.

Chang, H. M., Foo, H. L., Loh, T. C., Lim, E. T. C., & Mutalib, N. E. A. (2021). Comparative Studies of Inhibitory and Antioxidant Activities, and Organic Acids Compositions of Postbiotics Produced by Probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* Strains Isolated From Malaysian Foods. *Frontiers in Veterinary Science*, 7.

Chen, K., Chen, M., Liu, J., Lin, C., ve Chiu, H. (2005). Optimization of incorporated prebiotics as coating materials for probiotic microencapsulation. *Journal of Food Science*, 70(5).

Collado, M. C., ve Sanz, Y. (2006). Method for direct selection of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains from human feces based on their acid-adaptation ability. *Journal of Microbiological Methods*, 66(3), 560–563.

- Corr, S. C., Li, Y., Riedel, C. U., O'Toole, P. W., Hill, C., ve Gahan, C. G. M. (2007). Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(18), 7617–7621.
- Cruz, M. R., Graham, C. E., Gagliano, B. C., Lorenz, M. C., ve Garsin, D. A. (2013). *Enterococcus faecalis* Inhibits Hyphal Morphogenesis and Virulence of *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 81(1), 189–200.
- Cuevas-González, P., Liceaga, A., ve Aguilar-Toalá, J. (2020). Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. *Food Research International*, 136, 109502.
- Cuevas-González, P., Liceaga, A., ve Aguilar-Toalá, J. (2020b). Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. *Food Research International*, 136, 109502.
- De Almada, C. N., Almada, C. N., Martinez, R. C., ve Sant'Ana, A. S. (2016). Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. *Trends in Food Science ve Technology*, 58, 96–114.
- De Man, J. C., Rogosa, M., ve Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(1), 130–135.
- Fisher, K., ve Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155(6), 1749–1757.
- Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2, 106–117.
- Gao, J., Li, X., Zhang, G., Sadiq, F. A., Simal-Gandara, J., Xiao, J., ve Sang, Y. (2021). Probiotics in the dairy industry—Advances and opportunities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(4), 3937–3982.

Gao, S., Lewis, G. D., Ashokkumar, M., ve Hemar, Y. (2014). Inactivation of microorganisms by low-frequency high-power ultrasound: 1. Effect of growth phase and capsule properties of the bacteria. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(1), 446–453.

Gibson, J. H., Yong, D. H. N., Farnood, R. R., ve Seto, P. (2008). A literature review of ultrasound technology and its application in wastewater disinfection. *Water Quality Research Journal of Canada*, 43(1), 23–35.

Gill, H. S., ve Guarner, F. (2004). Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgraduate Medical Journal*, 80(947), 516–526.

Gill, H., ve Prasad, J. (2007). Probiotics, immunomodulation, and health benefits. In *Springer eBooks* (pp. 423–454).

Gilmore, M. S., Clewell, D. B., Ike, Y., ve Shankar, N. (2014). Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. *Massachusetts Eye and Ear Infirmary*.

Granato, D., ve De Araújo Calado, V. M. (2013). The use and importance of design of experiments (DOE) in process modelling in food science and technology. *John Wiley ve Sons*, 1–18.

Hammes, W. P., ve Hertel, C. (2006a). The genera *lactobacillus* and *carnobacterium*. In *Springer eBooks* (pp. 320–403).

Hidron, A. I., Edwards, J. R., Patel, J., Horan, T. C., Sievert, D. M., Pollock, D. A., ve Fridkin, S. K. (2008). Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections: Annual Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 29(11), 996–1011.

Holzapfel, W. (2005). Introduction to prebiotics and probiotics. In *CRC Press eBooks* (pp. 1–34).

Joyce, E., Al-Hashimi, A., ve Mason, T. (2011). Assessing the effect of different ultrasonic frequencies on bacterial viability using flow cytometry. *Journal of Applied Microbiology*, 110(4), 862–870.

Juneja, V. K., ve Sofos, J. N. (2002). Thermal inactivation of microorganisms. In M. Dekker (Ed.), *Control of foodborne microorganisms. Food Science and Technology*. (pp. 13e53).

Kaper, J. B., Nataro, J. P., ve Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews. Microbiology*, 2(2), 123–140.

Karczewski, J., Troost, F. J., Konings, I., Dekker, J., Kleerebezem, M., Brummer, R. M., ve Wells, J. M. (2010). Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactiplantibacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology/American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298(6), G851–G859.

Kavita, N., Om, H., Chand, U., & Kushawaha, P. K. (2024). Postbiotics: an alternative and innovative intervention for the therapy of inflammatory bowel disease. *Microbiological Research*, 279, 127550.

Kawase, M., He, F., Kubota, A., Yoda, K., Miyazawa, K., ve Hiramatsu, M. (2011b). Heat-killed *Lactobacillus gasseri* TMC0356 protects mice against influenza virus infection by stimulating gut and respiratory immune responses. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 64(2), 280–288.

Kim, K., Lee, Y., Chae, W., & Cho, J. (2022). An improved method to quantify Short-Chain fatty acids in biological samples using gas Chromatography–Mass spectrometry. *Metabolites*, 12(6), 525.

Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., ve Lee, D. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science ve Technology*, 15(5), 261–266.

Lee, Y., ve Salminen, S. (1995). The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science ve Technology*, 6(7), 241–245.

Lieu, D. M., Tran, G. T. C., Nguyen, N. T., ve Dang, T. T. K. (2023). Improvement of Probiotic Viability by Mixing with Ultrasound-Treated Yeast Cells and Spray Drying. *Current Microbiology*, 80(4).

MacFaddin, J. F. (1976). Biochemical tests for identification of medical bacteria. Williams ve Wilkins Co eBooks.

Maehata, H., Arai, S., Iwabuchi, N., & Abe, F. (2021). Immuno-modulation by heat-killed *Lacticaseibacillus paracasei* MCC1849 and its application to food products. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 35, 205873842110082.

Marco, M. L., Sanders, M. E., Gänzle, M., Arrieta, M. C., Cotter, P. D., De Vuyst, L., . . . Hutkins, R. (2021). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 18(3), 196–208.

Marteau, P., ve Shanahan, F. (2003). Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Baillière's Best Practice ve Research. Clinical Gastroenterology/Baillière's Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology*, 17(5), 725–740.

Martyniak, A., Medyńska-Przęczek, A., Wędrychowicz, A., Skoczeń, S., & Tomasik, P. J. (2021). Prebiotics, probiotics, synbiotics, paraprobiotics and postbiotic compounds in IBD. *Biomolecules*, 11(12), 1903.

Murillo-Martínez, M. M., Tello-Solís, S. R., García-Sánchez, M. A., ve Ponce-Alquicira, E. (2013). Antimicrobial Activity and Hydrophobicity of Edible Whey Protein Isolate Films Formulated with Nisin and/or Glucose Oxidase. *Journal of Food Science*, 78(4).

Nakamura, F., Ishida, Y., Sawada, D., Ashida, N., Sugawara, T., Sakai, M., . . . Fujiwara, S. (2016). Fragmented lactic acid bacterial cells activate peroxisome Proliferator-Activated receptors and ameliorate dyslipidemia in obese mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(12), 2549–2559.

Nataro, J. P., ve Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), 142–201.

Ng, S. C., Hart, A. L., Kamm, M. A., Stagg, A. J., ve Knight, S. C. (2009). Mechanisms of action of probiotics: Recent advances. *Inflammatory Bowel Diseases*, 15(2), 300–310.

Oelschlaeger, T. A. (2010). Mechanisms of probiotic actions – A review. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(1), 57–62.

Otte, J., ve Podolsky, D. K. (2004). Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology/American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 286(4), G613–G626.

Ou, C., Ko, J., ve Lin, M. (2020). Antioxidative effects of intracellular extracts of yogurt bacteria on lipid peroxidation and intestine 407 cells. *Yàowù Shípǐn Fēnxī*, 14(3).

Paéz, R., Lavari, L., Vinderola, G., Audero, G., Cuatrin, A., Zaritzky, N., ve Reinheimer, J. (2012). Effect of heat treatment and spray drying on lactobacilli viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 48(2), 748–754.

Paulsen, I. T., Banerjee, L., Myers, G. S. A., Nelson, K. E., Seshadri, R., Read, T. D., . . . Fraser, C. M. (2003). Role of Mobile DNA in the Evolution of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*, 299(5615), 2071–2074.

Parvarej, M. M., Fazeli, M. R., Mortazavian, A. M., Nezhad, S. S., ve Mortazavi, S. A. (2020). Comparative effect of probiotic and paraprobiotic addition on rheological and sensory properties of yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 74(1), 95–106.

Pitout, J. D. D. (2012). Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance. *Frontiers in Microbiology*, 3.

Piyasena, P., Mohareb, E., ve McKellar, R. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 87(3), 207–216.

- Rahimi, D., Sadeghi, A., Kashaninejad, M., & Ebrahimi, M. (2024). Postbiotic characterization of a potential probiotic yeast isolate, and its microencapsulation in alginate beads coated layer-by-layer with chitosan. *Heliyon*, 10(7), e28452.
- Rangel, J. M., Sparling, P. H., Crowe, C., Griffin, P. M., ve Swerdlow, D. L. (2005). Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982–2002. *Emerging Infectious Diseases*, 11(4), 603–609.
- Rivière, A., Selak, M., Lantin, D., Leroy, F., ve De Vuyst, L. (2016). *Bifidobacteria* and Butyrate-Producing colon bacteria: Importance and strategies for their stimulation in the human gut. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Ross, A. I., Griffiths, M. W., Mittal, G. S., ve Deeth, H. C. (2003). Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 89(2–3), 125–138.
- Sanders, M. E. (2008). Probiotics: Definition, sources, selection, and uses. *Clinical Infectious Diseases/Clinical Infectious Diseases* (Online. University of Chicago. Press), 46(s2), S58–S61.
- Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., ve Rastall, R. A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature Reviews. Gastroenterology ve Hepatology*, 16(10), 605–616.
- Sawada, D., Sugawara, T., Ishida, Y., Aihara, K., Aoki, Y., Takehara, I., . . . Fujiwara, S. (2016). Effect of continuous ingestion of a beverage prepared with *Lactobacillus gasseri* CP2305 inactivated by heat treatment on the regulation of intestinal function. *Food Research International*, 79, 33–39.
- Segers, M. E., ve Lebeer, S. (2014). Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG - host interactions. *Microbial Cell Factories*, 13(Suppl 1), S7.
- Servin, A. L. (2004). Antagonistic activities of *lactobacilli* and *bifidobacteria* against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(4), 405–440.

Shah, N. (2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 83(4), 894–907.

Shields, P., ve Cathcart, L. (2010). Oxidase Test Protocol. American Society for Microbiology.

Shin, H. S., Park, S. Y., Lee, D. K., Kim, S. A., An, H. M., Kim, J. R., . . . Ha, N. J. (2010). Hypocholesterolemic effect of sonication-killed *Bifidobacterium longum* isolated from healthy adult Koreans in high cholesterol fed rats. *Archives of Pharmacal Research*, 33(9), 1425–1431.

Taverniti, V., ve Guglielmetti, S. (2011). The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes ve Nutrition*, 6(3), 261–274.

Teame, T., Wang, A., Xie, M., Zhang, Z., Yang, Y., Ding, Q., . . . Zhou, Z. (2020). Paraprobiotics and postbiotics of probiotic lactobacilli, their positive effects on the host and action mechanisms: a review. *Frontiers in Nutrition*, 7.

Tsilingiri, K., ve Rescigno, M. (2013). Postbiotics: what else? *Beneficial Microbes*, 4(1), 101–107.

Tsilingiri, K., Barbosa, T., Penna, G., Caprioli, F., Sonzogni, A., Viale, G., ve Rescigno, M. (2012). Probiotic and postbiotic activity in health and disease: comparison on a novel polarised ex-vivo organ culture model. *Gut*, 61(7), 1007–1015.

Valero, M., Recrosio, N., Saura, D., Muñoz, N., Martí, N., ve Lizama, V. (2007). Effects of ultrasonic treatments in orange juice processing. *Journal of Food Engineering*, 80(2), 509–516.

Vinderola, C., ve Reinheimer, J. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36(9–10), 895–904.

Vinderola, G., Binetti, A., Burns, P., ve Reinheimer, J. (2011b). Cell viability and functionality of probiotic bacteria in dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 2.

Wen, J., Smelt, J. P. P. M., Vischer, N. O. E., De Vos, A. L., Setlow, P., & Brul, S. (2022). Heat activation and inactivation of bacterial spores: is there an overlap? *Applied and Environmental Microbiology*, 88(5).

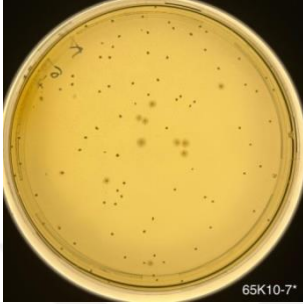
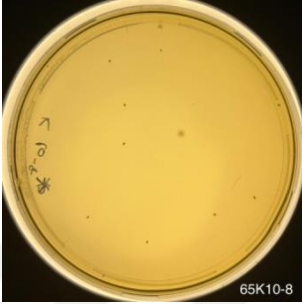
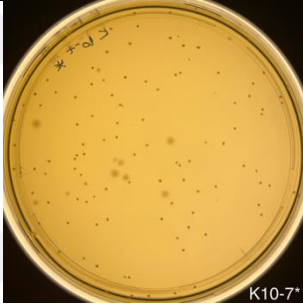
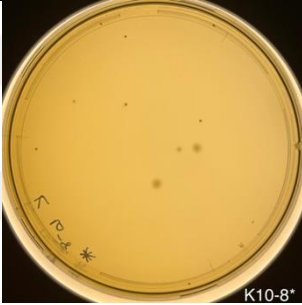
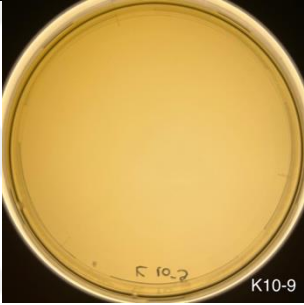
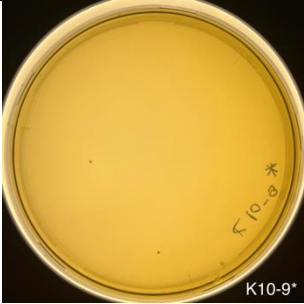
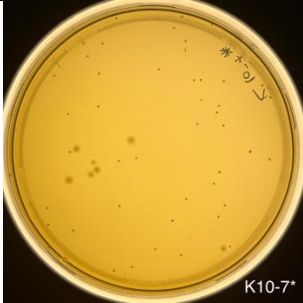
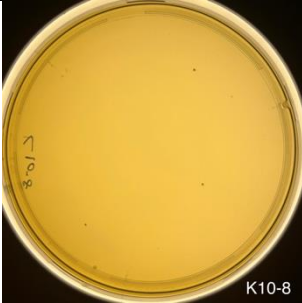
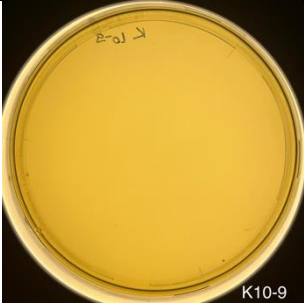
Yao, L., Davidson, E. A., Shaikh, M. W., Forsyth, C. B., Prenni, J. E., & Broeckling, C. D. (2022). Quantitative analysis of short-chain fatty acids in human plasma and serum by GC–MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry/Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 414(15), 4391–4399.

Zhang, J., Wang, L., Guo, Z., Sun, Z., Gesudu, Q., Kwok, L., . . . Zhang, H. (2014). 454 pyrosequencing reveals changes in the faecal microbiota of adults consuming *Lactocaseibacillus casei*. *FEMS Microbiology Ecology/FEMS Microbiology, Ecology*, 88(3), 612–622.

Żółkiewicz, J., Marzec, A., Ruszczyński, M., & Feleszko, W. (2020). Postbiotics—A step beyond pre- and probiotics. *Nutrients*, 12(8), 2189.

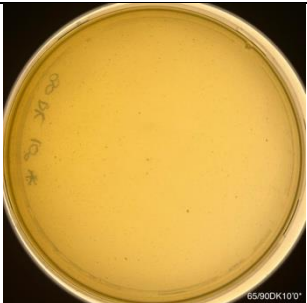
EKLER

Ek A1 Isıl işleme maruz bırakılmadan ekim yapılan *Lactobacillus acidophilus* LA-5 içeren kontrol mikroorganizmalarının ekimden 48 saat sonraki petri görüntüleri.*

İşlem	a	b	c
Sıcaklığı			
65 °C			
75 °C			
85 °C			
95 °C			

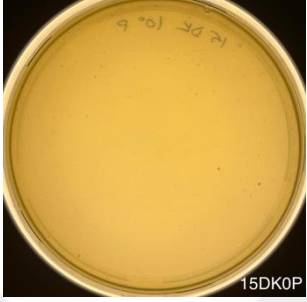
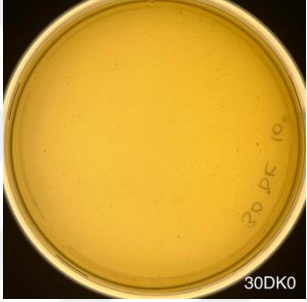
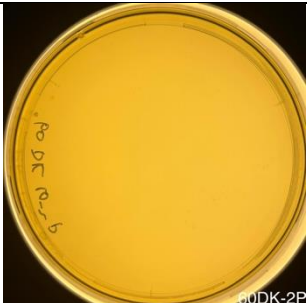
* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^7 düzeyinde seyreltilmiş olan kontrol örneklerine; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^8 düzeyinde seyreltilmiş olan kontrol örneklerine; “c” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^9 düzeyinde seyreltilmiş olan kontrol örneklerine aittir.

Ek A2 65 °C ısıtıl işlem sıcaklığında deneme planındaki sürelerle işlenen *Lactobacillus acidophilus* LA-5 probiyotiklerinin, işlem sonrasındaki ekimden 48 saat sonraki petri görüntüleri.*

İşlem Sıcaklığı	İşlem Süresi	a	b	c
65 °C	30 dk			
	45 dk			
	60 dk			
	90 dk			

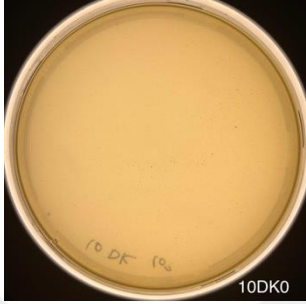
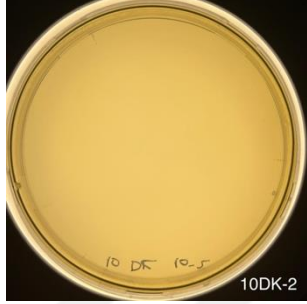
* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler herhangi bir seyreltilme yapılmamış olan örneklerle; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^2 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “c” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle aittir.

Ek A3 75 °C ısıtılma işlem sıcaklığında deneme planındaki sürelerle işlenen *Lactobacillus acidophilus* LA-5 probiyotiklerinin, işlem sonrasındaki ekimden 48 saat sonraki petri görüntüleri.*

İşlem Sıcaklığı	İşlem Süresi	a	b	c
75 °C	15 dk			
	30 dk			
	45 dk			
	60 dk			

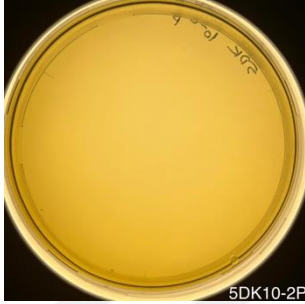
* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler herhangi bir seyreltilme yapılmamış olan örneklere; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^2 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklere; “c” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklere aittir.

Ek A4 85 °C ısıtma işlem sıcaklığında deneme planındaki sürelerle işlenen *Lactobacillus acidophilus* LA-5 probiyotiklerinin, işlem sonrasındaki ekimden 48 saat sonraki petri görüntüleri. *

İşlem Sıcaklığı	İşlem Süresi	a	b	c
85 °C	10 dk			
	15 dk			
	30 dk			
	45 dk			

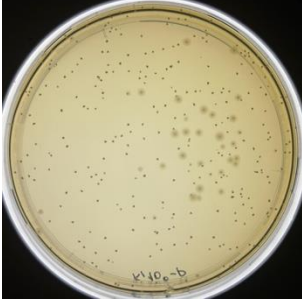
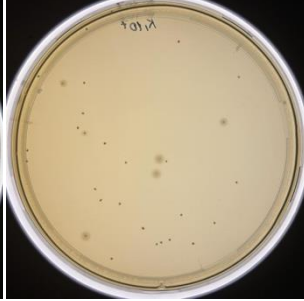
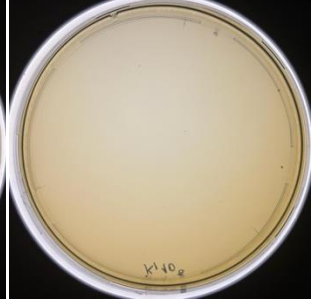
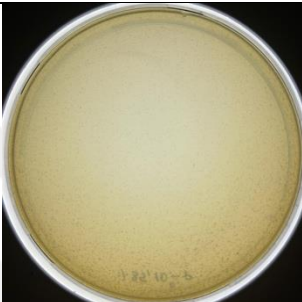
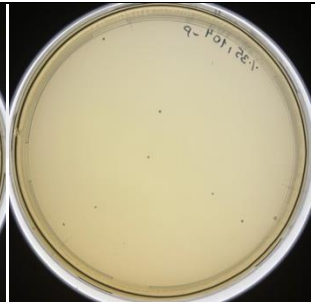
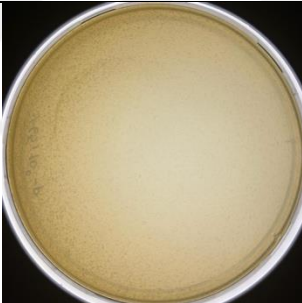
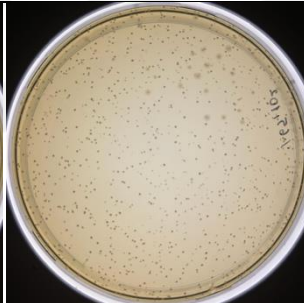
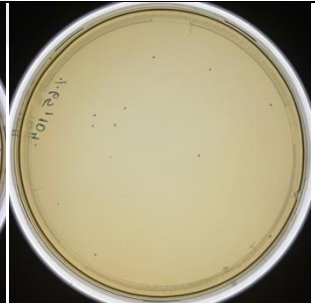
* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler herhangi bir seyreltilme yapılmamış olan örneklerle; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^2 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “c” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle aittir.

Ek A5 95 °C ısıtılma işlem sıcaklığında deneme planındaki sürelerle işlenen *Lactobacillus acidophilus* LA-5 probiyotiklerinin, işlem sonrasındaki ekimden 48 saat sonraki petri görüntüleri.*

İşlem Sıcaklığı	İşlem Süresi	a	b	c
95 °C	5 dk			
	10 dk			
	15 dk			
	30 dk			

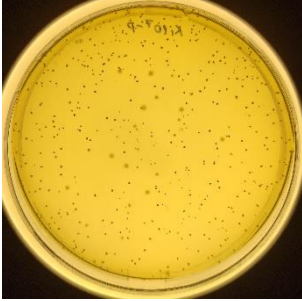
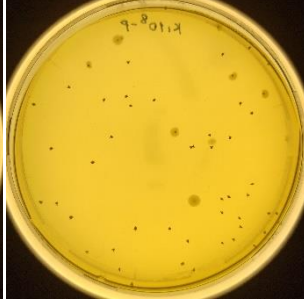
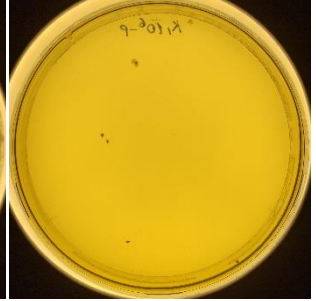
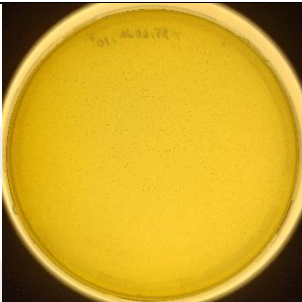
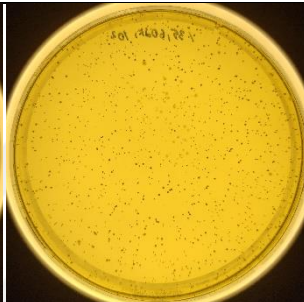
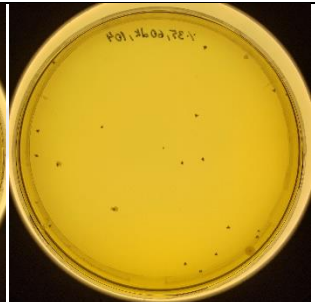
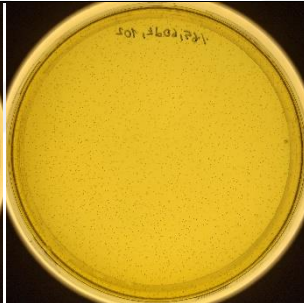
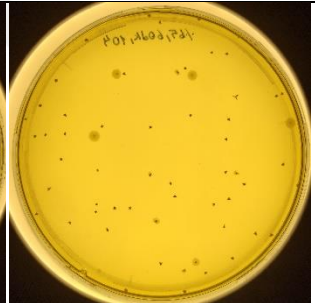
* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler herhangi bir seyreltilme yapılmamış olan örneklerle; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^2 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “c” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle aittir.

Ek A6 Ultrases işleme için yapılan deneme sonuçları.*

Genlik (µm)	İşlem Süresi	a	b	c
Kontrol				
172	45 dk			
320	45 dk			

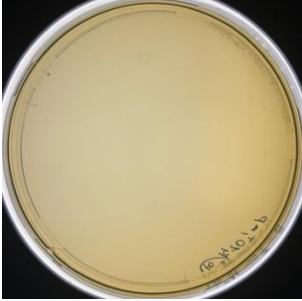
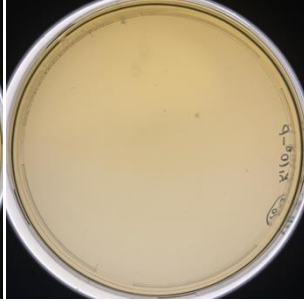
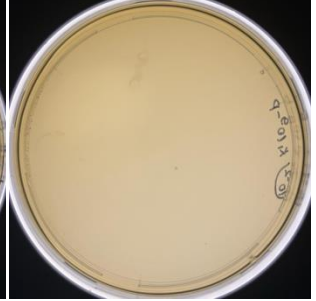
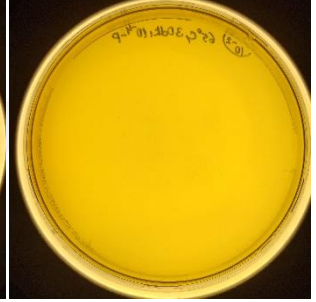
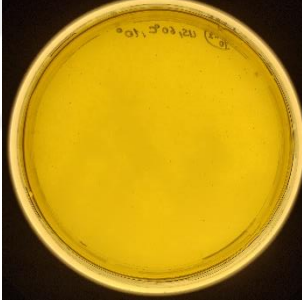
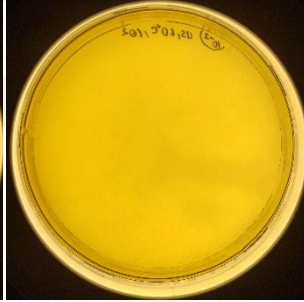
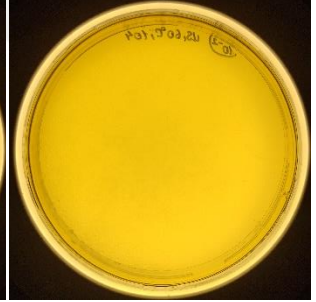
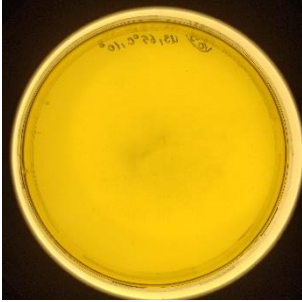
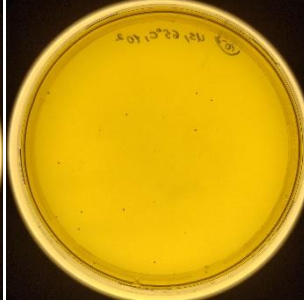
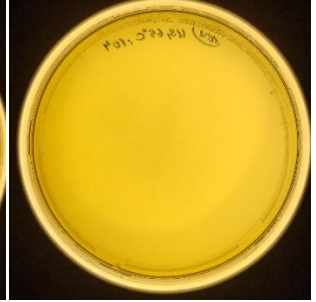
* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler kontrol grubu için 10^7 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnekler için ise seyreltilmemiş olan örnekler; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler kontrol grubu için 10^8 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnekler için ise 10^2 düzeyinde seyreltilmiş olan örnekler; “c” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler kontrol grubu için 10^9 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnekler için ise 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örnekler aittir.

Ek A7 Ultrases işleme için yapılan ön deneme sonuçları.*

Genlik (µm)	İşlem Süresi	a	b	c
Kontrol				
172	60 dk			
320	60 dk			

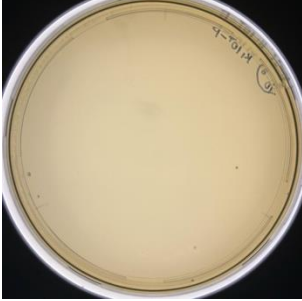
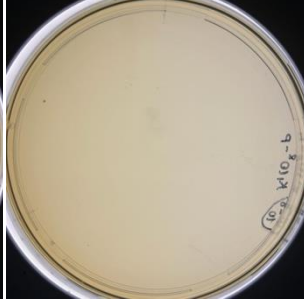
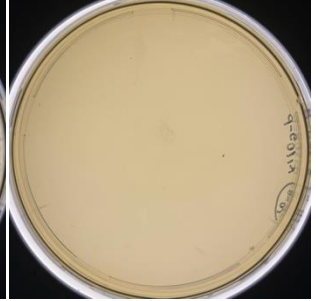
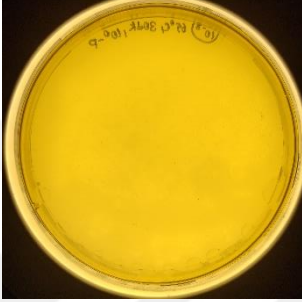
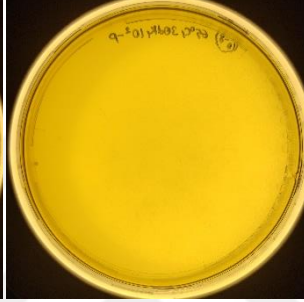
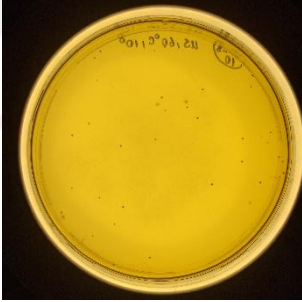
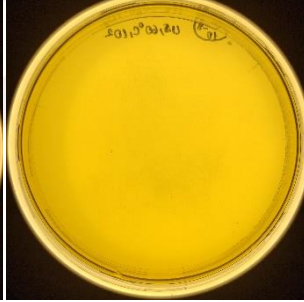
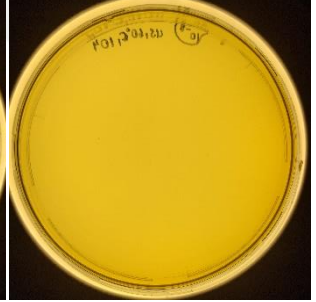
* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler kontrol grubu için 10^7 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnekler için ise seyreltilmemiş olan örnekler; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler kontrol grubu için 10^8 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnekler için ise 10^2 düzeyinde seyreltilmiş olan örnekler; “c” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler kontrol grubu için 10^9 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnekler için ise 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örnekler aittir.

Ek A8 Ultrases işleme için yapılan ön denemenin ilk setinin sonuçları.*

Genlik (μm)	İşlem Süresi	a	b	c
Kontrol-1				
Isıl İşlem				
320	60 dk (60 °C)			
320	60 dk (65 °C)			

* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler kontrol grupları için 10^7 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnekler için ise seyreltilmemiş olan örneklere; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler kontrol grupları için 10^8 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnekler için ise 10^2 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklere; “c” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler kontrol grupları için 10^9 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnekler için ise 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklere aittir.

Ek A9 Ultrases işleme için yapılan ön denemenin ikinci setinin sonuçları.*

Genlik (µm)	İşlem Süresi	a	b	c
Kontrol-2				
Isıl İşlem				
320	60 dk (60 °C)			

* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler kontrol grupları için 10^7 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnekler için ise seyreltilmemiş olan örneklerle; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler kontrol grupları için 10^8 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnekler için ise 10^2 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “c” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler kontrol grupları için 10^9 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnekler için ise 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle aittir.

Ek A10 Ultrases işleme ile ilgili yapılan ön deneme setinin petri görüntüleri.*

Probiyotik

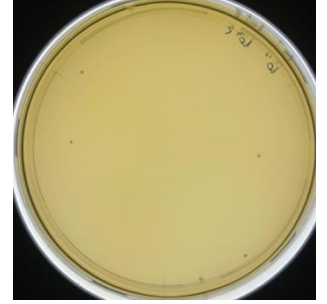
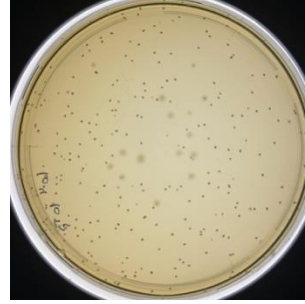
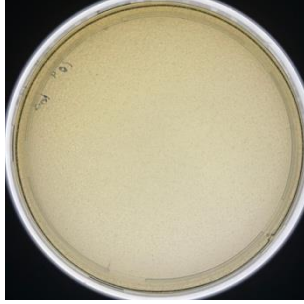
Konsantrasyonu
(g/mL)

a

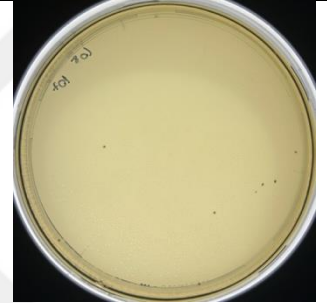
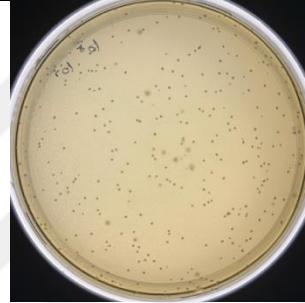
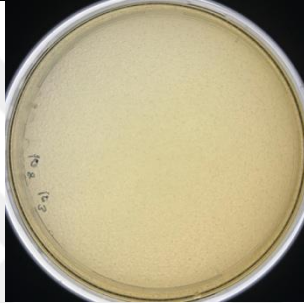
b

c

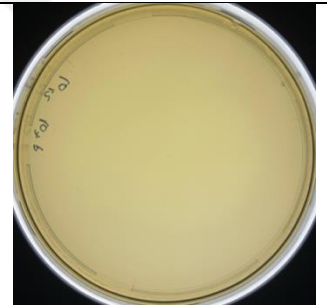
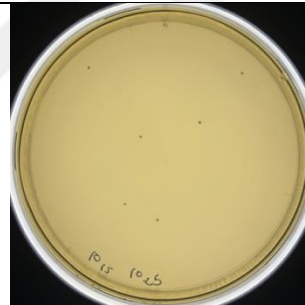
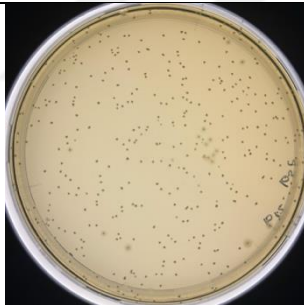
$0,1 \times 10^{-4}$



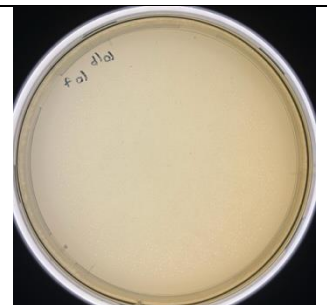
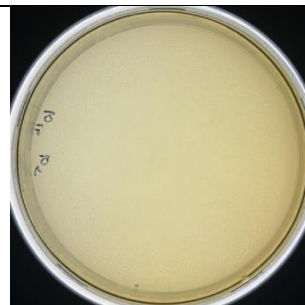
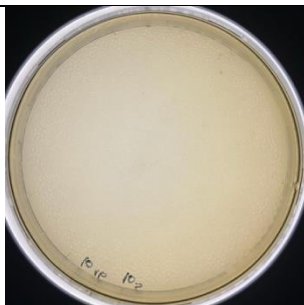
$0,1 \times 10^{-8}$



$0,1 \times 10^{-12}$

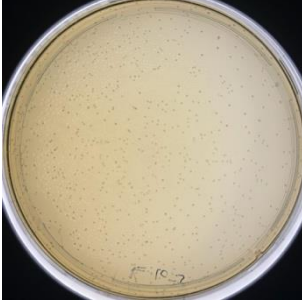
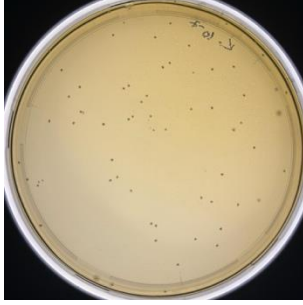
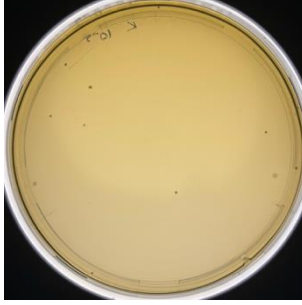
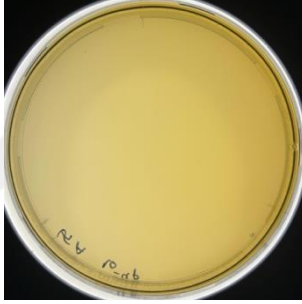


$0,1 \times 10^{-16}$



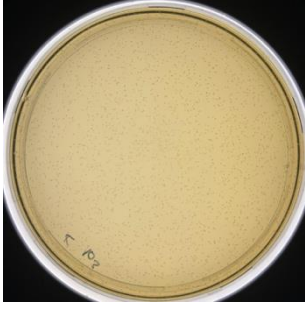
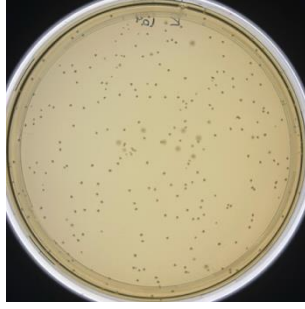
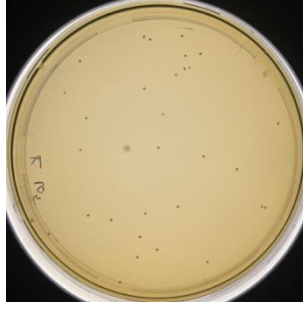
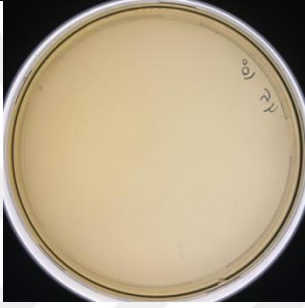
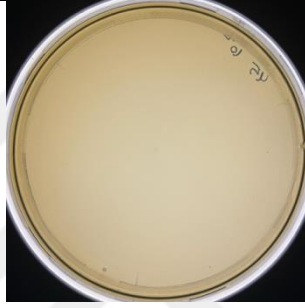
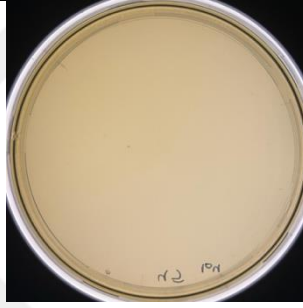
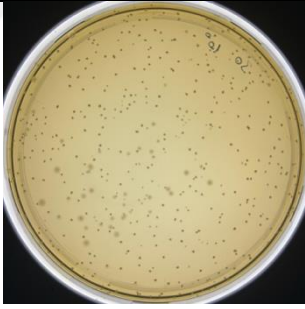
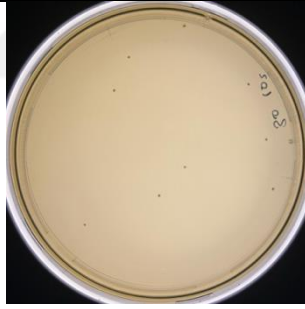
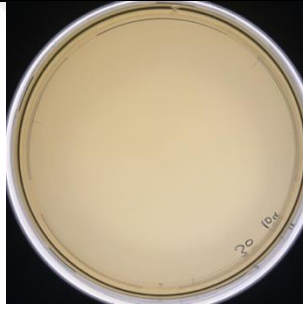
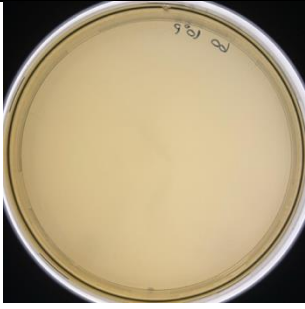
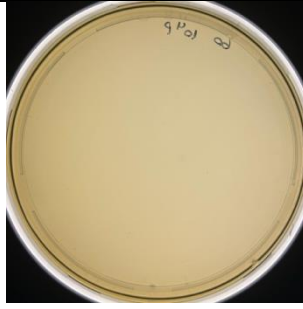
* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^3 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklere; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^5 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklere; “c” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^7 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklere aittir.

Ek A11 Ultrases işleme ile ilgili yapılan ön deneme setinin petri görüntüleri.*

Örnek	a	b	c
Kontrol			
320 µm, 65 °C, 60 dk Ultrases İşleme			

* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler kontrol grubu için 10^3 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnek için ise seyreltilmemiş olan örneklere; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler kontrol grubu için 10^4 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnek için ise 10^2 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklere; “c” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler kontrol grubu için 10^5 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnek için ise 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklere aittir.

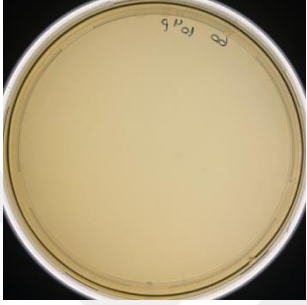
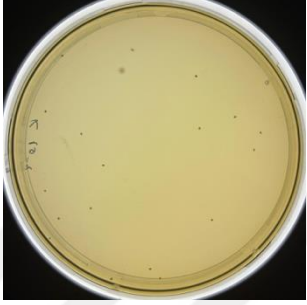
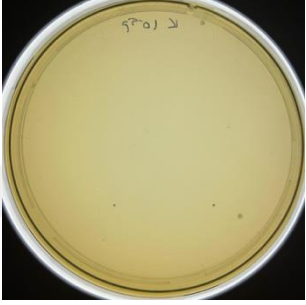
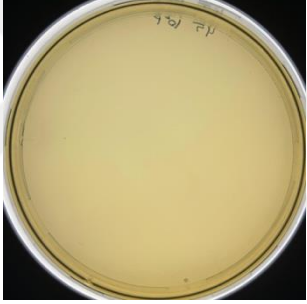
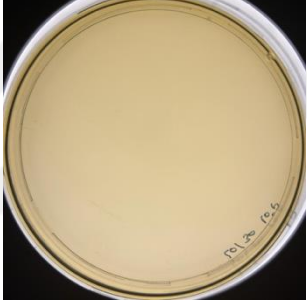
Ek A12 Ultrases ile işlem gören 1.set *Lactobacillus acidophilus* LA-5 probiyotiklerinin, işlem sonrasındaki ekimden 48 saat sonraki petri görüntüleri.*

Örnek Kodu	İşlem Koşulları	a	b	c
Kontrol				
3	98 µm 45 dk			
14	320 µm 30 dk			
16	320 µm 60 dk			

* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler kontrol grubu için 10^3 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnek için ise seyreltilmemiş olan örneklerle; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler kontrol grubu için 10^4 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnek için ise 10^2 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “c” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler

kontrol grubu için 10^5 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnek için ise 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle aittir.

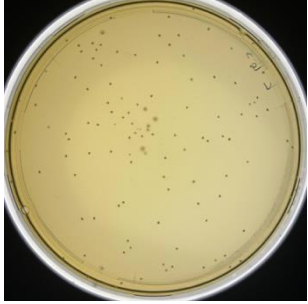
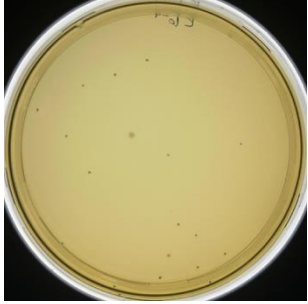
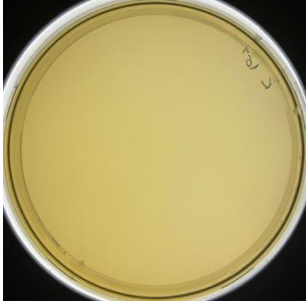
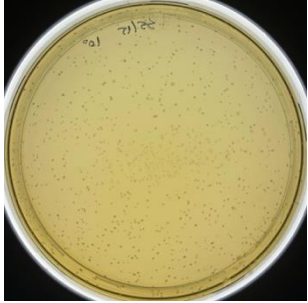
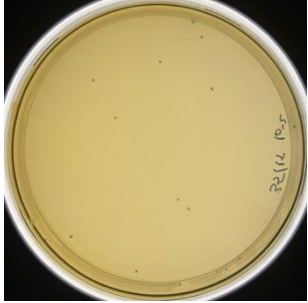
Ek A13 Ultrases ile işlem gören 2.set *Lactobacillus acidophilus* LA-5 probiyotiklerinin, işlem sonrasındaki ekimden 48 saat sonraki petri görüntüleri.*

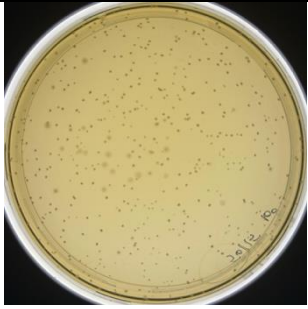
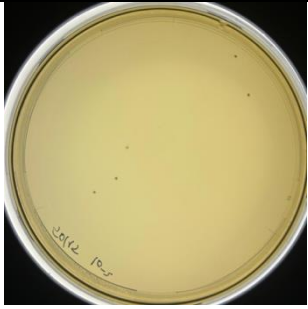
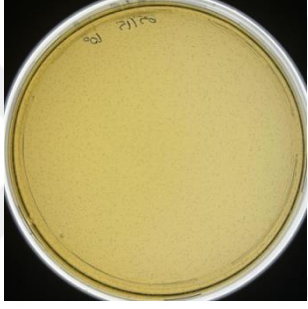
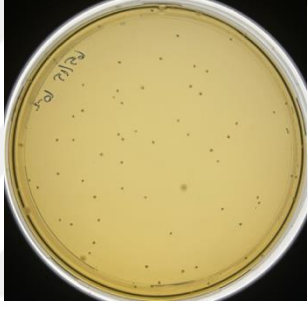
Örnek Kodu	İşlem Koşulları	a	b	c
Kontrol				
2	98 μ m 30 dk			
6	172 μ m 30 dk			
8	172 μ m 60 dk			

11	246 μ m 45 dk			
----	----------------------	---	--	---

* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler kontrol grubu için 10^3 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnek için ise seyreltilmemiş olan örneklerle; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler kontrol grubu için 10^4 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnek için ise 10^2 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “c” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler kontrol grubu için 10^5 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnek için ise 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle aittir.

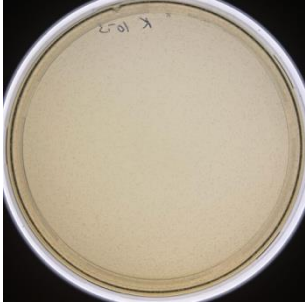
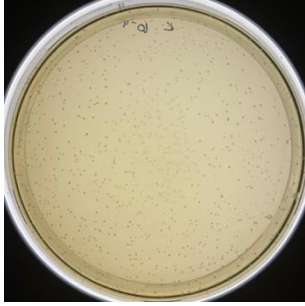
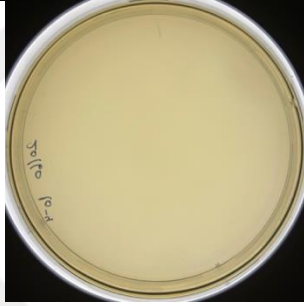
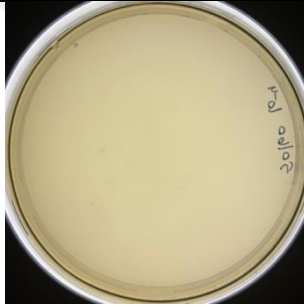
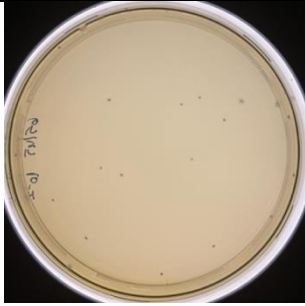
Ek A14 Ultrases ile işlem gören 3.set *Lactobacillus acidophilus* LA-5 probiyotiklerinin, işlem sonrasındaki ekimden 48 saat sonraki petri görüntüleri.*

Örnek Kodu	İşlem Koşulları	a	b	c
Kontrol				
5	172 μ m 15 dk			

9	246 µm 15 dk			
10	246 µm 30 dk			
13	320 µm 15 dk			

* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler kontrol grubu için 10^3 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnek için ise seyreltilmemiş olan örneklerle; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler kontrol grubu için 10^4 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnek için ise 10^2 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “c” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler kontrol grubu için 10^5 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnek için ise 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle aittir.

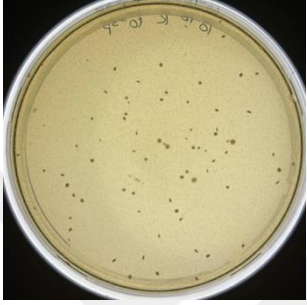
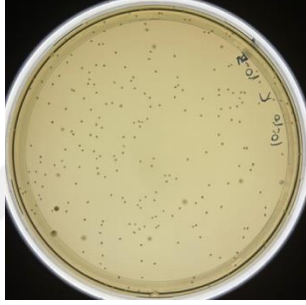
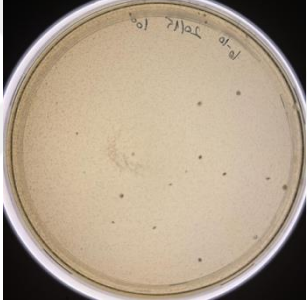
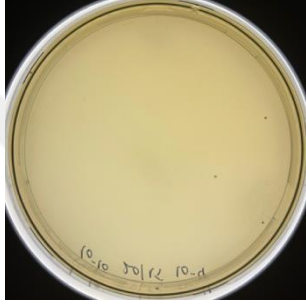
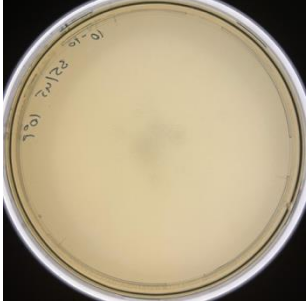
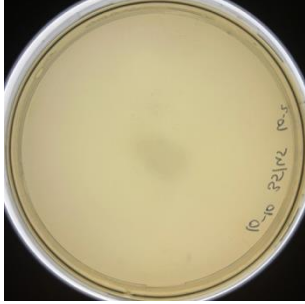
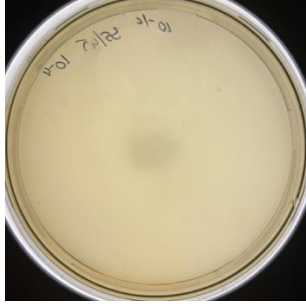
Ek A15 Ultrases ile işlem gören 4.set *Lactobacillus acidophilus* LA-5 probiyotiklerinin, işlem sonrasındaki ekimden 48 saat sonraki petri görüntüleri.*

Örnek Kodu	İşlem Koşulları	a	b	c
Kontrol				
4	98 µm 60 dk			
12	246 µm 60 dk			
15	320 µm 45 dk			

* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler kontrol grubu için 10^3 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnek için ise seyreltilmemiş olan örneklerle; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler kontrol grubu için 10^4 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnek için ise 10^2 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “c” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler

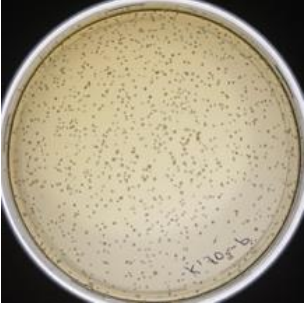
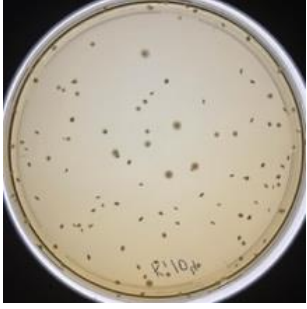
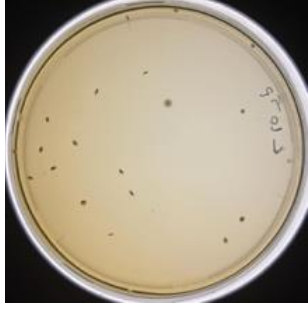
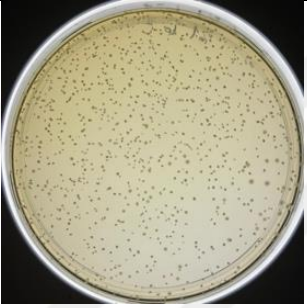
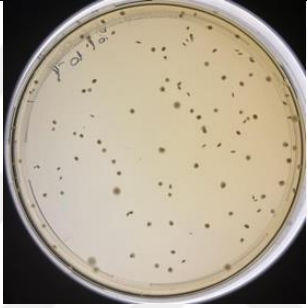
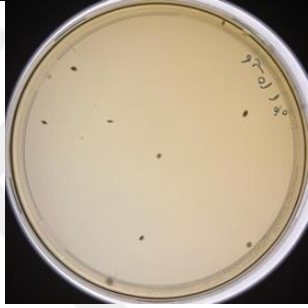
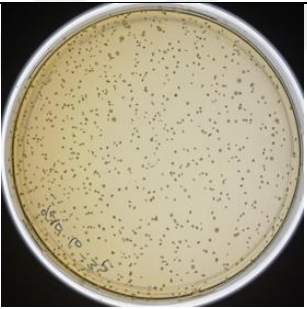
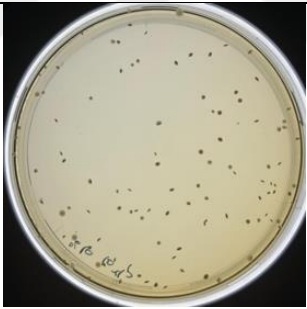
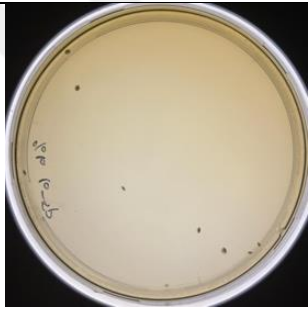
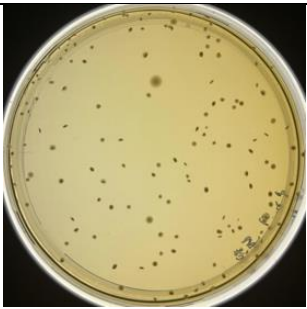
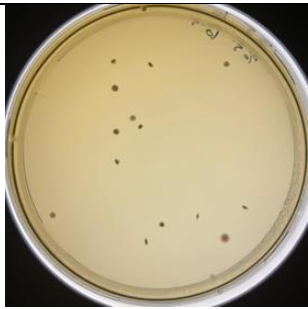
kontrol grubu için 10^5 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnek için ise 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle aittir.

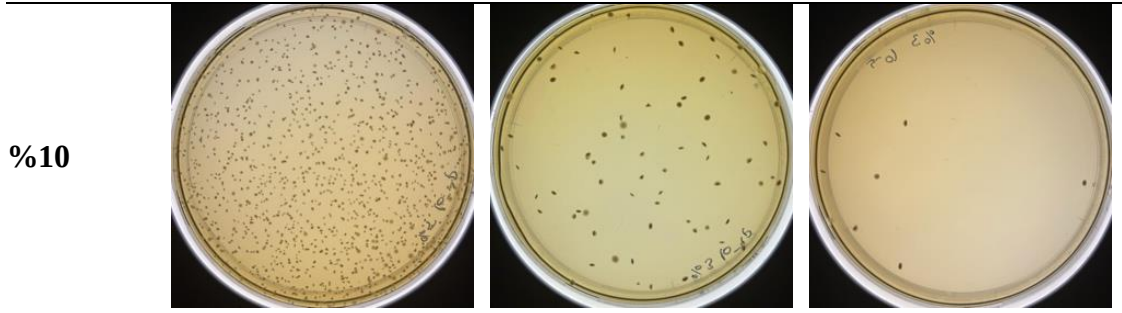
Ek A16 Ultrases ile işlem gören 5.set *Lactobacillus acidophilus* LA-5 probiyotiklerinin, işlem sonrasındaki ekimden 48 saat sonraki petri görüntüleri.*

Örnek Kodu	İşlem Koşulları	a	b	c
Kontrol				
1	98 µm 15 dk			
7	172 µm 45 dk			

* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler kontrol grubu için 10^3 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnek için ise seyreltilmemiş olan örneklerle; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler kontrol grubu için 10^4 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnek için ise 10^2 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “c” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler kontrol grubu için 10^5 düzeyinde seyreltilmiş, işlem görmüş örnek için ise 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle aittir.

Ek B1 Probiyotik gelişimini arttırıcı aktivite analizi için yapılan ön deneme setinin petri görüntüleri.*

Postbiyotik Düzeyi	a	b	c
Kontrol			
%1			
%3			
%5			



* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^3 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “c” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^5 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle aittir.

Ek B2 Probiyotik gelişimini arttırıcı aktivite analizi için yapılan ön deneme setinin petri görüntüleri.*

Probiyotik

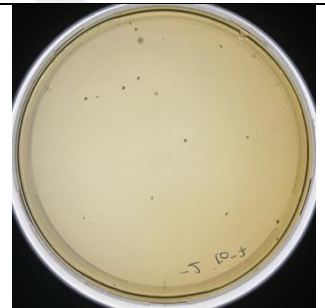
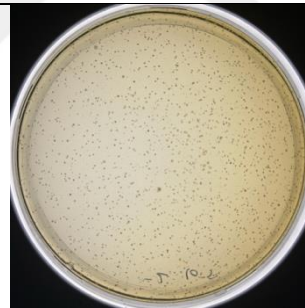
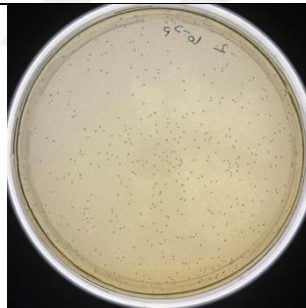
**Konsantrasyonu
(g/mL)**

a

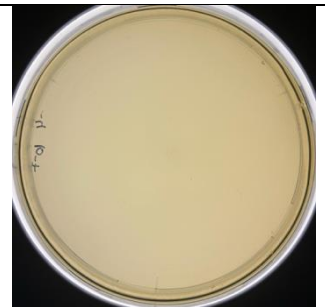
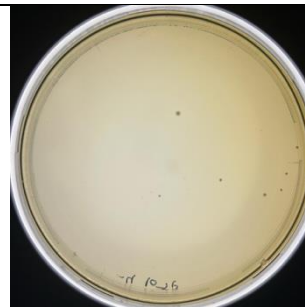
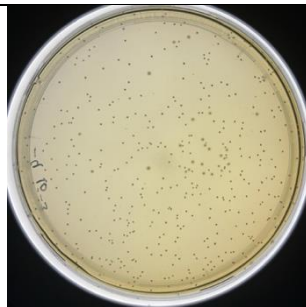
b

c

$0,1 \times 10^{-2}$

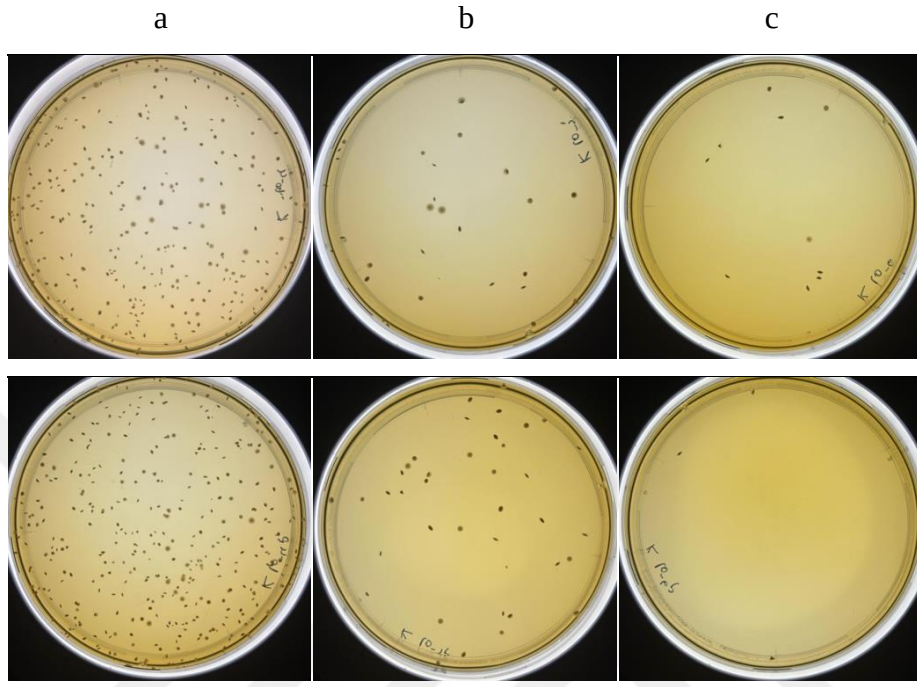


$0,1 \times 10^{-4}$



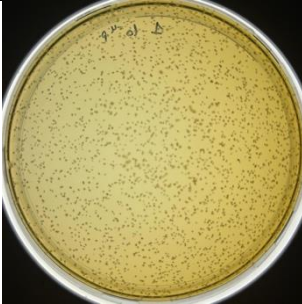
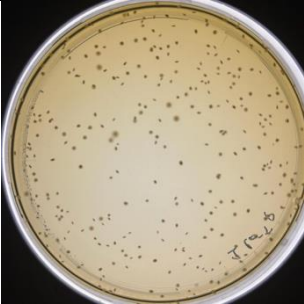
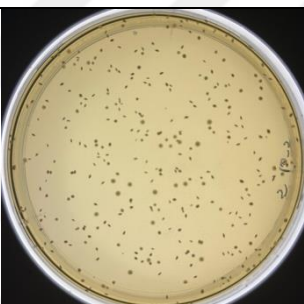
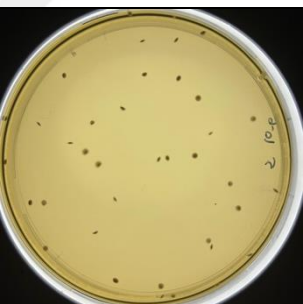
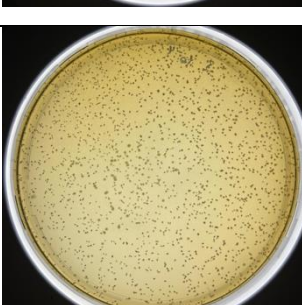
* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^3 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^5 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “c” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^7 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle aittir.

Ek B3 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak ısıl işlem ile elde edilmiş postbiyotiklerin *Lacticaseibacillus casei* 431 üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizi için yapılmış kontrol ekimleri petri görüntüleri.*



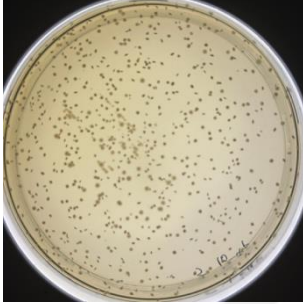
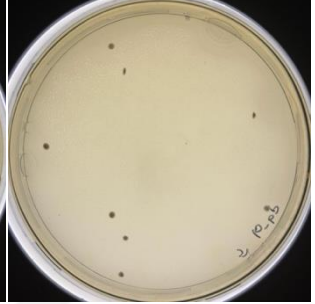
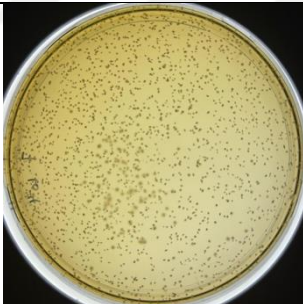
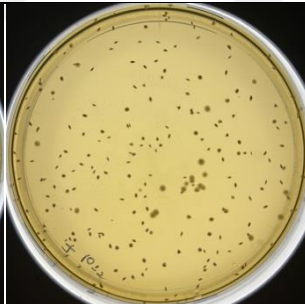
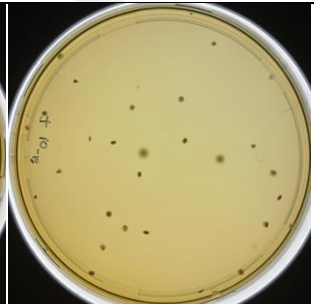
* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^5 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “c” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^6 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle aittir.

Ek B4 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak 65 °C ısıtılma sıcaklığında elde edilmiş postbiyotiklerin *Lacticaseibacillus casei* 431 üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizi sonucundaki petri görüntüleri.*

İşlem Sıcaklığı	İşlem Süresi	a	b	c
65 °C	30 dk			
	45 dk			
	60 dk			
	90 dk			

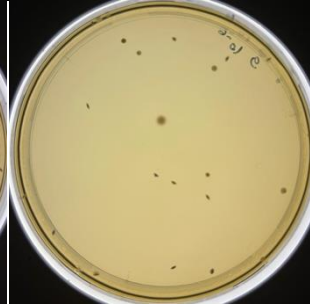
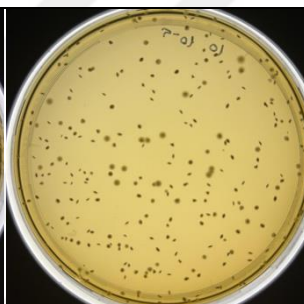
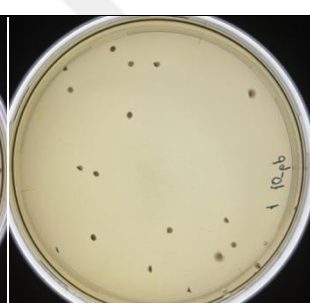
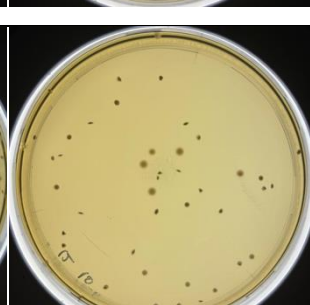
* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^5 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “c” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^6 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle aittir.

Ek B5 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak 75 °C ısıtıl işlem sıcaklığında elde edilmiş postbiyotiklerin *Lacticaseibacillus casei* 431 üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizi sonucundaki petri görüntüleri.*

İşlem Sıcaklığı	İşlem Süresi	a	b	c
75 °C	15 dk			
	30 dk			
	45 dk			
	60 dk			

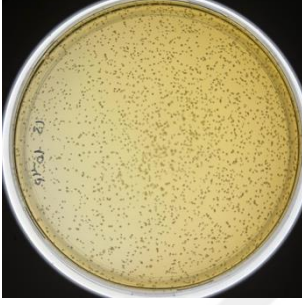
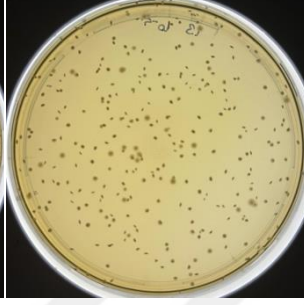
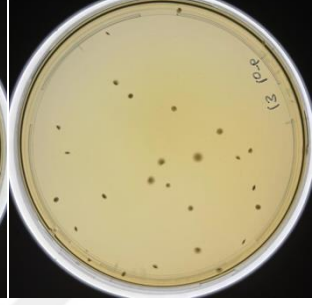
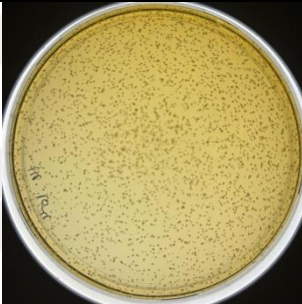
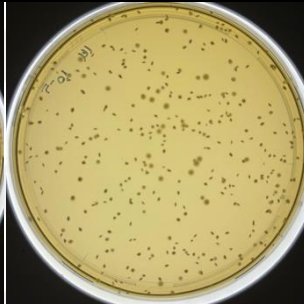
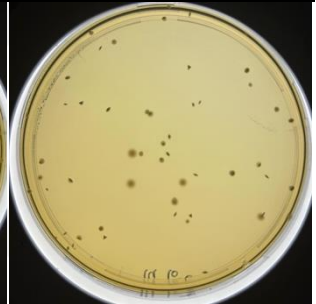
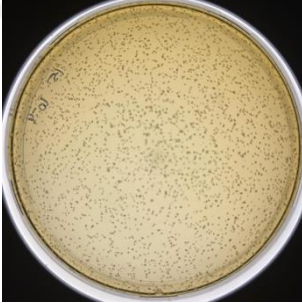
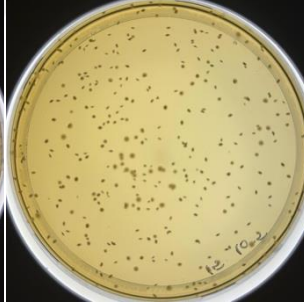
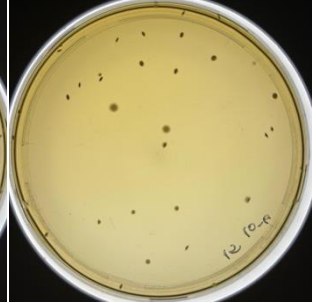
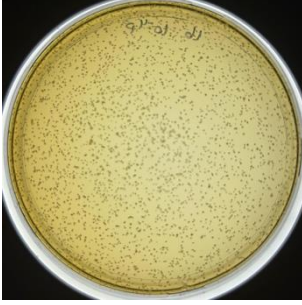
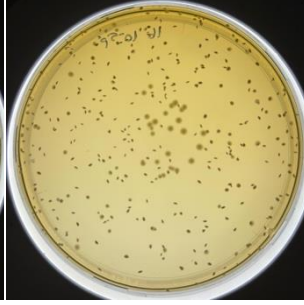
* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklere; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^5 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklere; “c” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^6 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklere aittir.

Ek B6 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak 85 °C ısıtıl işlem sıcaklığında elde edilmiş postbiyotiklerin *Lacticaseibacillus casei* 431 üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizi sonucundaki petri görüntüleri.*

İşlem Sıcaklığı	İşlem Süresi	a	b	c
85 °C	10 dk			
	15 dk			
	30 dk			
	45 dk			

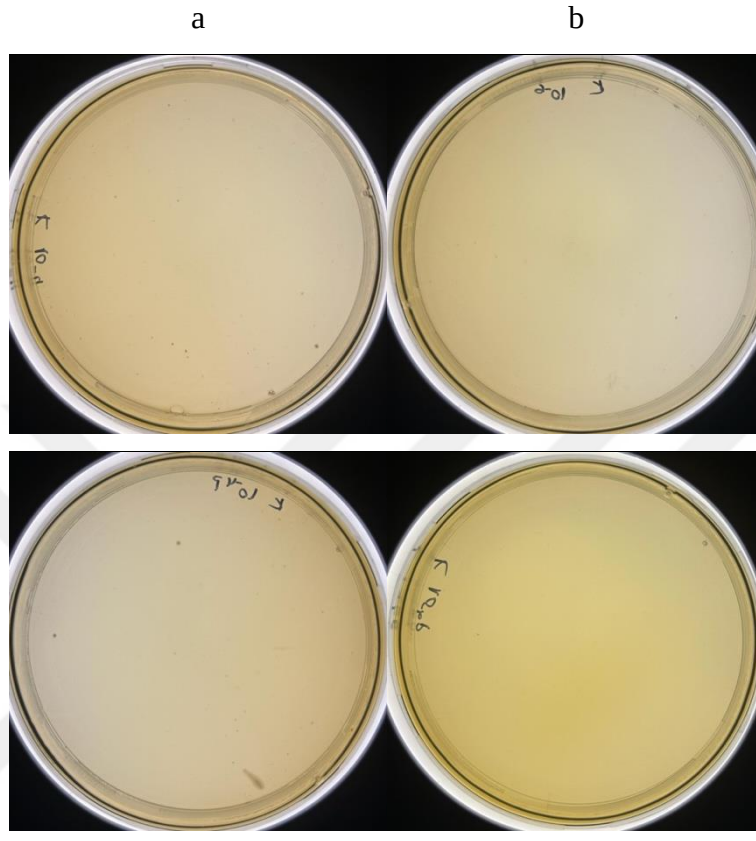
* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklere; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^5 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklere; “c” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^6 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklere aittir.

Ek B7 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak 95 °C ısıtıl işlem sıcaklığında elde edilmiş postbiyotiklerin *Lacticaseibacillus casei* 431 üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizi sonucundaki petri görüntüleri.*

İşlem Sıcaklığı	İşlem Süresi	a	b	c
95 °C	5 dk			
	10 dk			
	15 dk			
	30 dk			

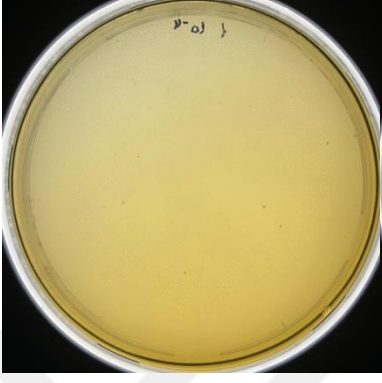
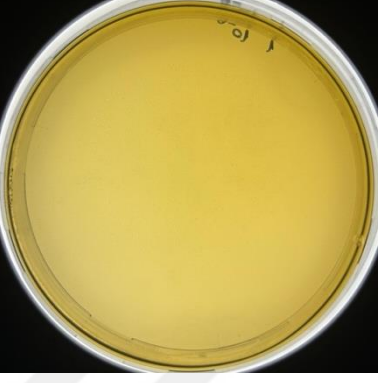
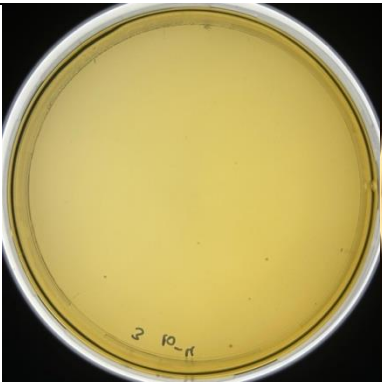
* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^5 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “c” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^6 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle aittir.

Ek B8 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak ısıt işlem ile elde edilmiş postbiyotiklerin *Bifidobacterium* kültürü üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizi için yapılmış kontrol ekimleri petri görüntüleri.*



* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^6 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle aittir.

Ek B9 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak 65 °C ısıtıl işlem sıcaklığında elde edilmiş postbiyotiklerin *Bifidobacterium* kültürü üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizi sonucundaki petri görüntüleri.*

İşlem Sıcaklığı	İşlem Süresi	a	b
65 °C	30 dk		
	45 dk		
	60 dk		

90 dk

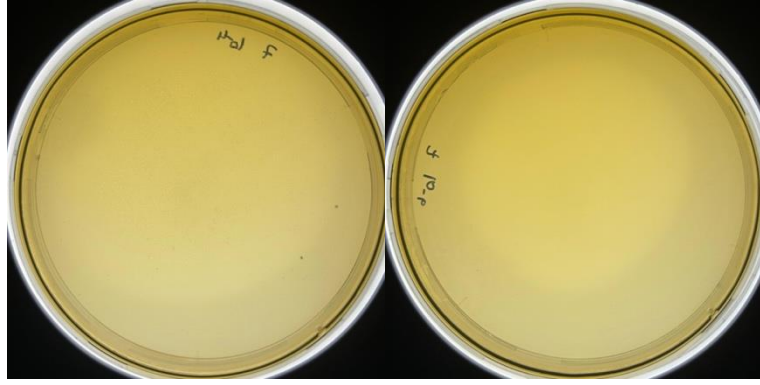


* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklere; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^6 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklere aittir.

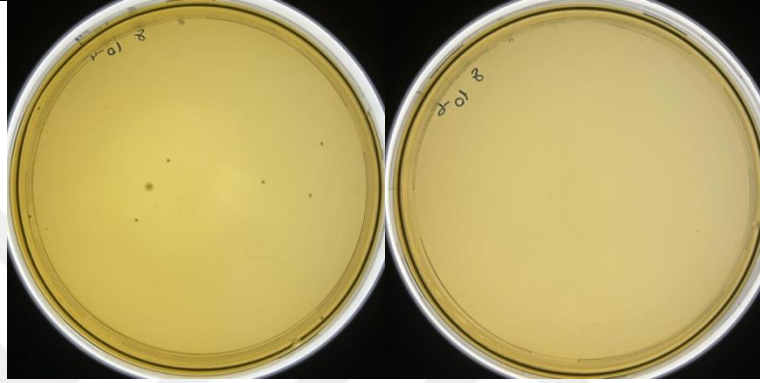
Ek B10 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak 75 °C ısıtma sıcaklığında elde edilmiş postbiyotiklerin *Bifidobacterium* kültürü üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizi sonucundaki petri görüntüleri.*

İşlem Sıcaklığı	İşlem Süresi	a	b
75 °C	15 dk		
	30 dk		

45 dk

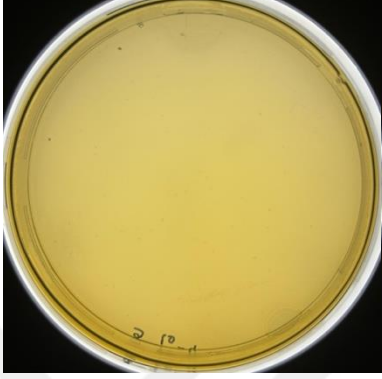
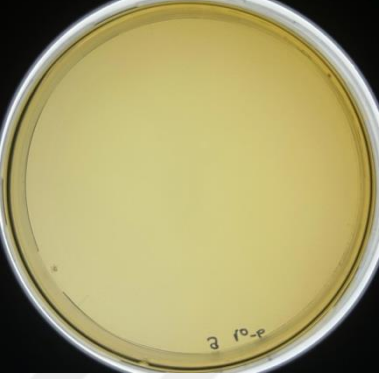
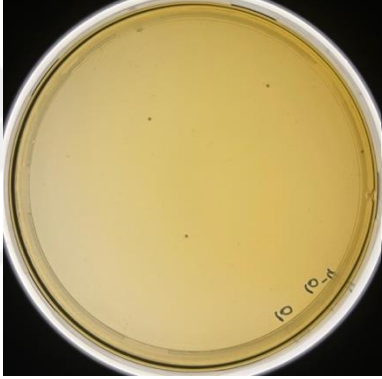
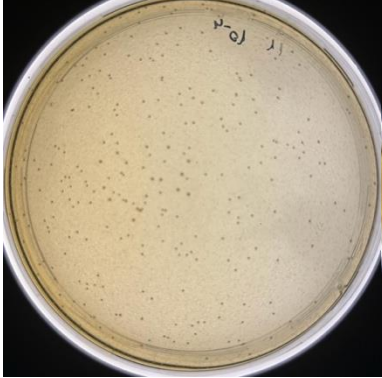
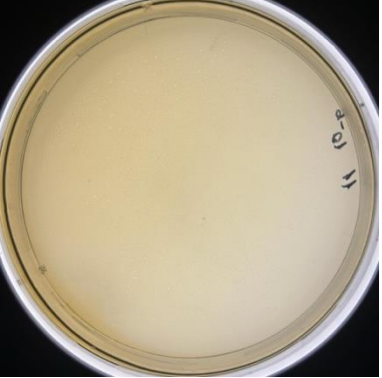


60 dk

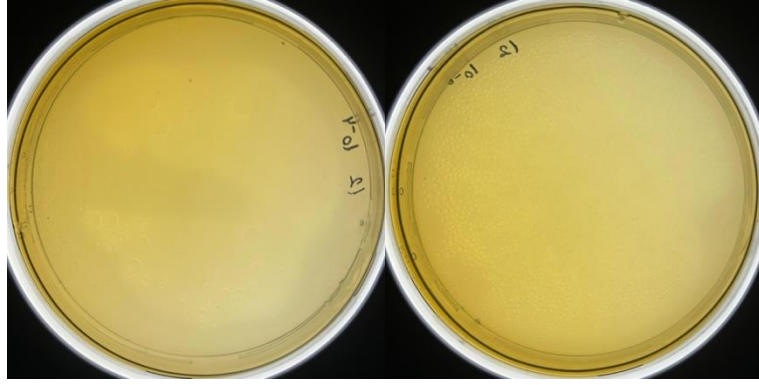


* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^6 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle aittir.

Ek B11 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak 85 °C ısıl işlem sıcaklığında elde edilmiş postbiyotiklerin *Bifidobacterium* kültürü üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizi sonucundaki petri görüntüleri.*

İşlem Sıcaklığı	İşlem Süresi	a	b
85 °C	10 dk		
	15 dk		
	30 dk		

45 dk

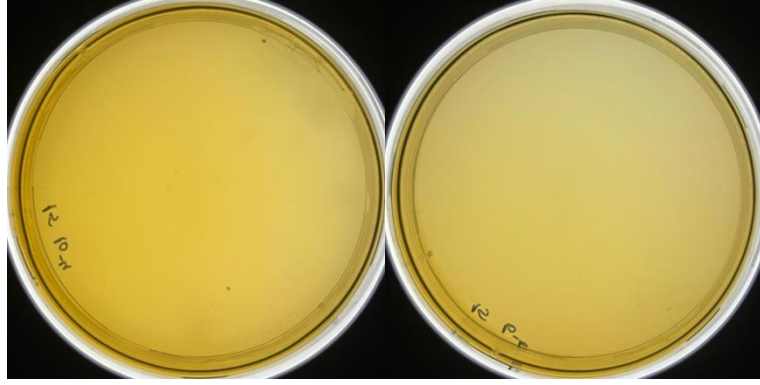


* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklere; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^6 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklere aittir.

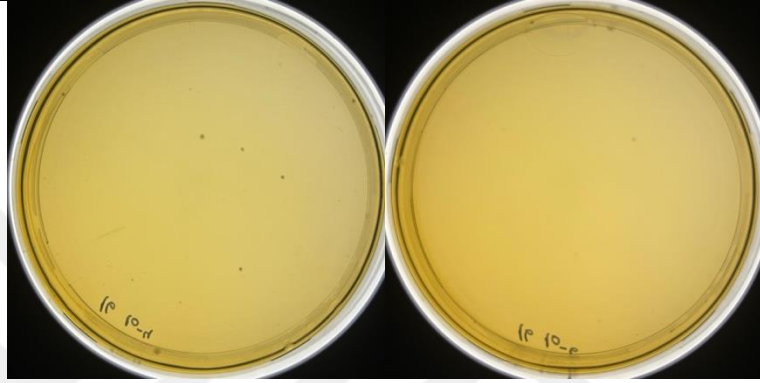
Ek B12 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak 95 °C ısıtma işlem sıcaklığında elde edilmiş postbiyotiklerin *Bifidobacterium* kültürü üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizi sonucundaki petri görüntüleri.*

İşlem Sıcaklığı	İşlem Süresi	a	b
95 °C	5 dk		
	10 dk		

15 dk

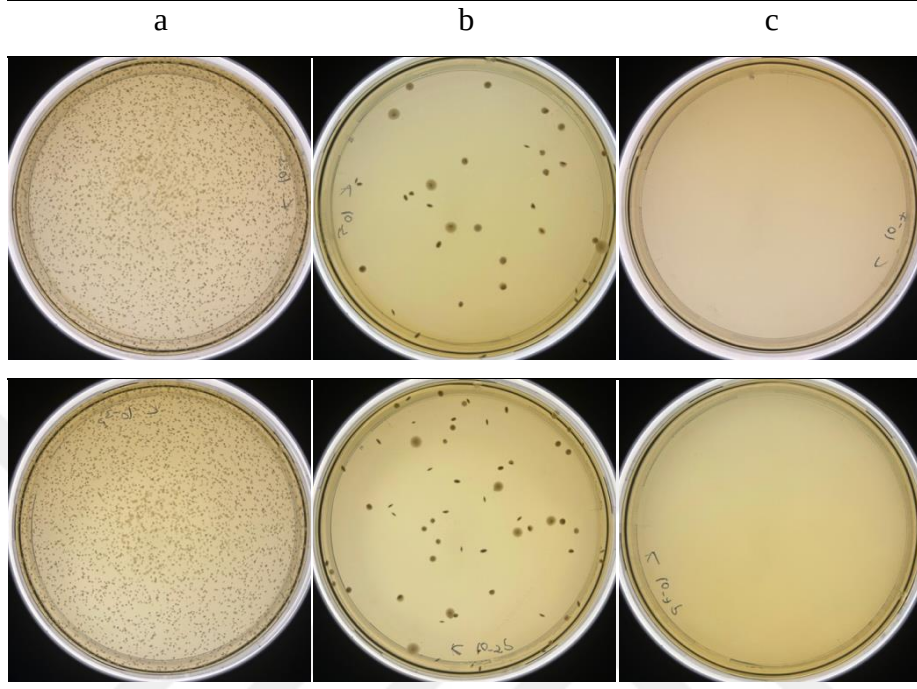


30 dk



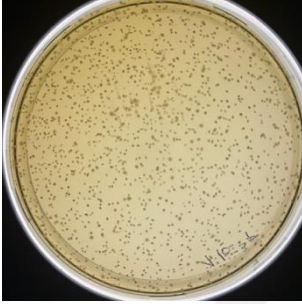
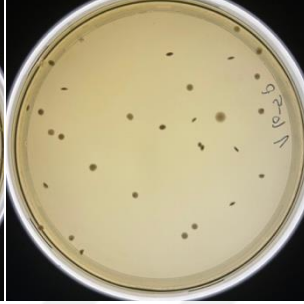
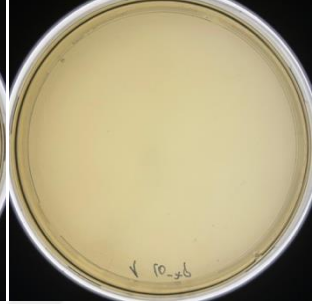
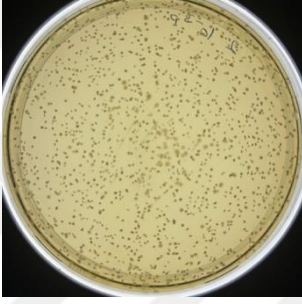
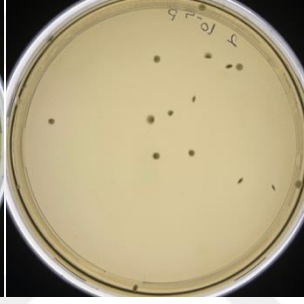
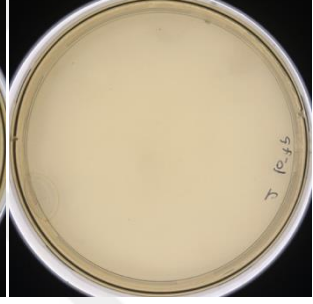
* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^6 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle aittir.

Ek B13 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak ultrases ile elde edilmiş postbiyotiklerin *Lactocaseibacillus casei* 431 üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizi için yapılmış kontrol ekimleri petri görüntüleri.*



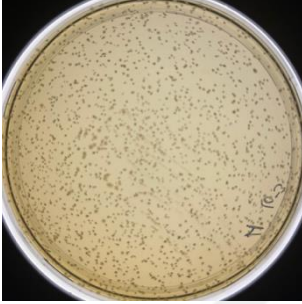
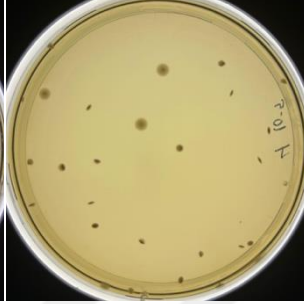
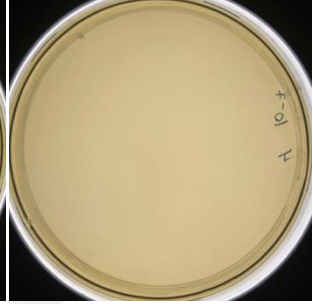
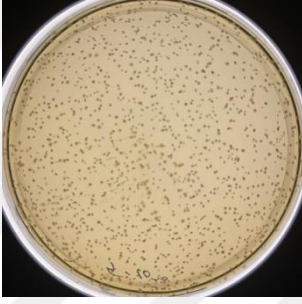
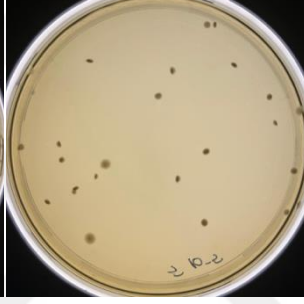
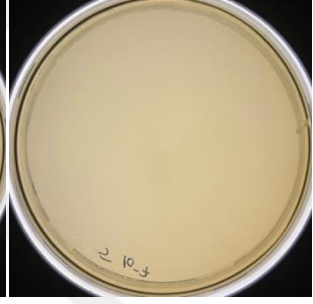
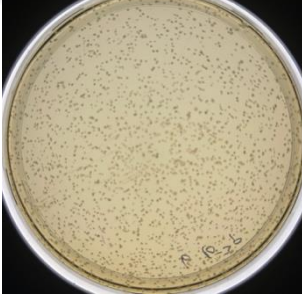
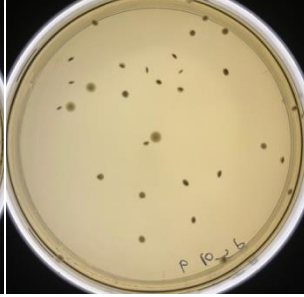
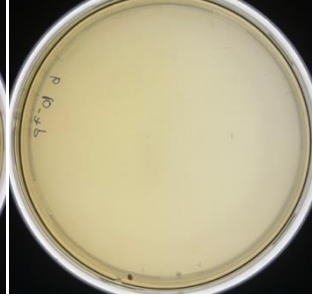
* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^3 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^5 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “c” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^7 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle aittir.

Ek B14 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak 98 µm genlikte ultrases ile elde edilmiş postbiyotiklerin *Lacticaseibacillus casei* 431 üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizi sonucundaki petri görüntüleri.*

Genlik (µm)	İşlem Süresi	a	b	c
98	30 dk			
	45 dk			
	60 dk			

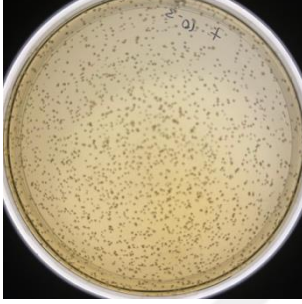
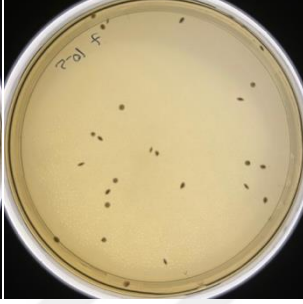
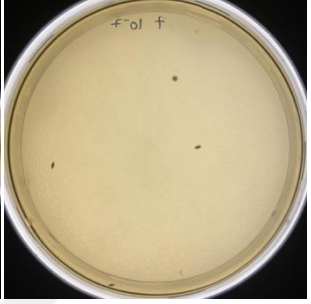
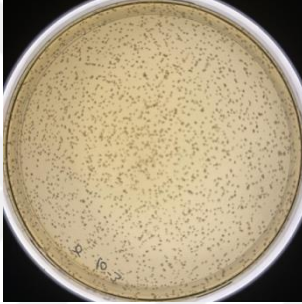
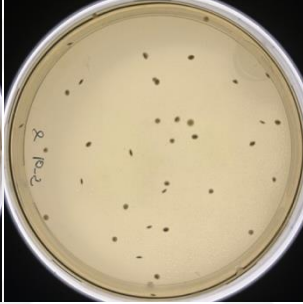
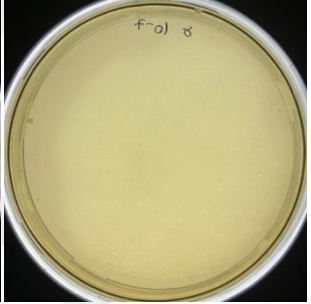
* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^3 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^5 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “c” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^7 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle aittir.

Ek B15 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak 172 µm genlikte ultrases ile elde edilmiş postbiyotiklerin *Lacticaseibacillus casei* 431 üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizi sonucundaki petri görüntüleri.*

Genlik (µm)	İşlem Süresi	a	b	c
172	30 dk			
	45 dk			
	60 dk			

* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^3 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^5 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “c” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^7 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle aittir.

Ek B16 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak 246 µm genlikte ultrases ile elde edilmiş postbiyotiklerin *Lacticaseibacillus casei* 431 üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizi sonucundaki petri görüntüleri.*

Genlik (µm)	İşlem Süresi	a	b	c
246	45 dk			
	60 dk			

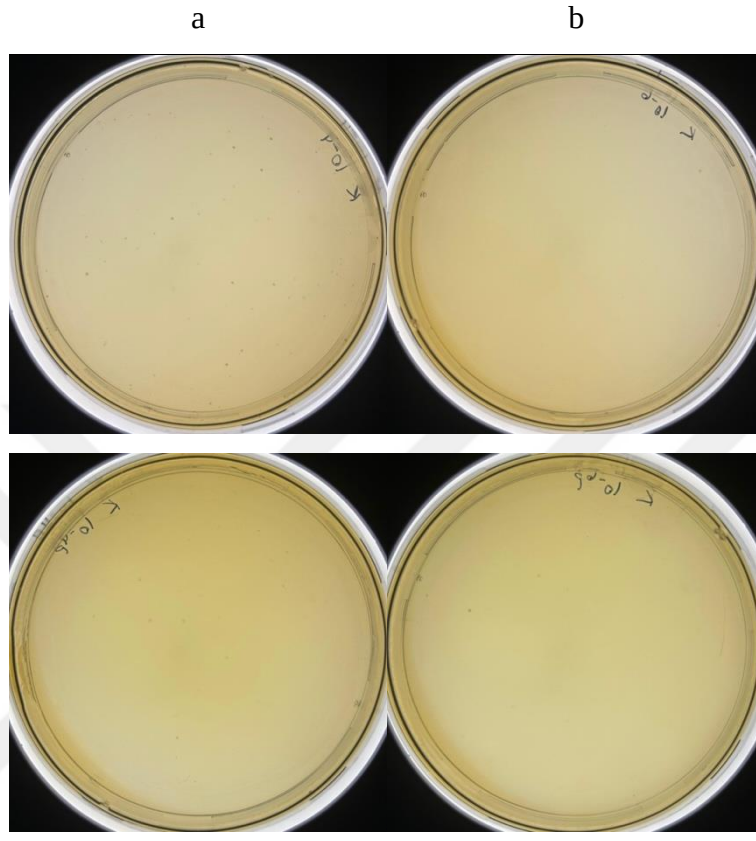
* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^3 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^5 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “c” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^7 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle aittir.

Ek B17 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak 320 µm genlikte ultrases ile elde edilmiş postbiyotiklerin *Lacticaseibacillus casei* 431 üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizi sonucundaki petri görüntüleri.*

Genlik (µm)	İşlem Süresi	a	b	c
320	45 dk			

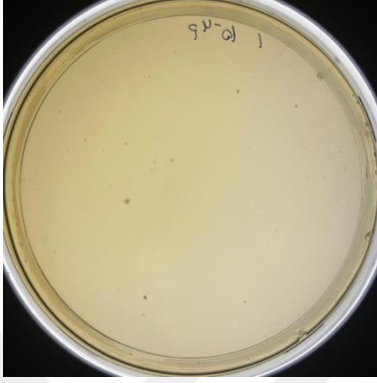
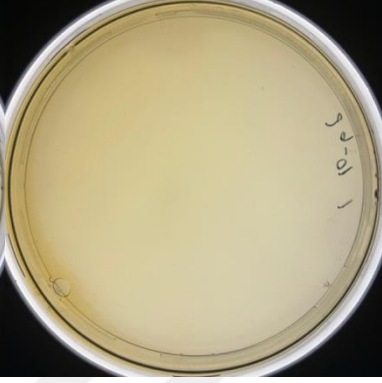
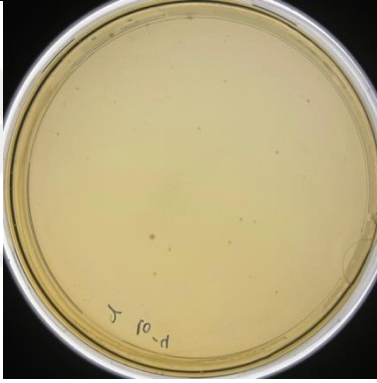
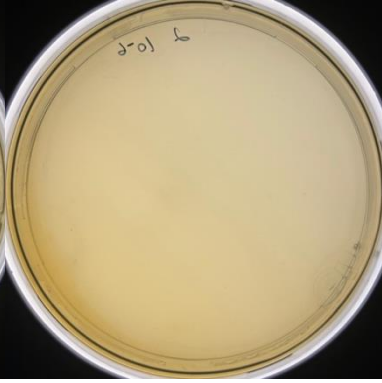
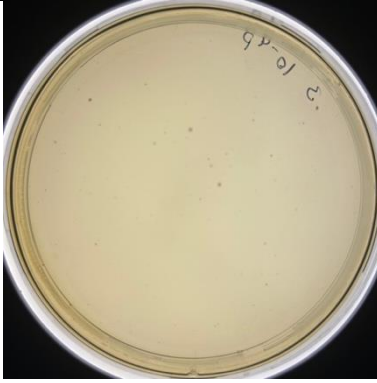
* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^3 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^5 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “c” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^7 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle aittir.

Ek B18 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak ultrases ile elde edilmiş postbiyotiklerin *Bifidobacterium* kültürü üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizi için yapılmış kontrol ekimleri petri görüntüleri.*



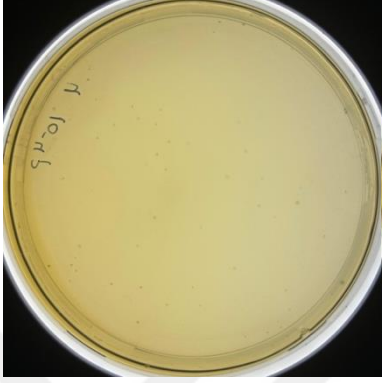
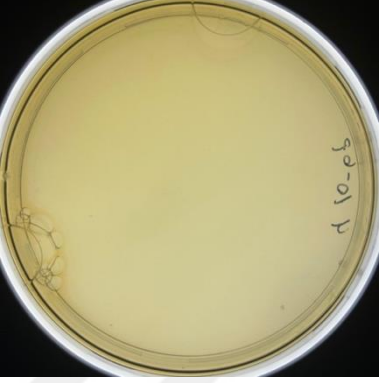
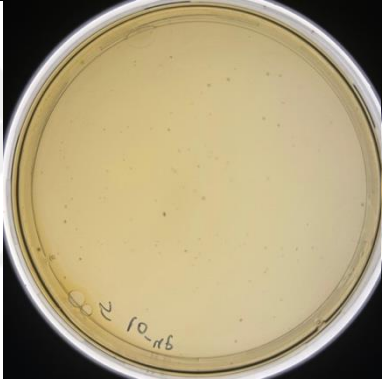
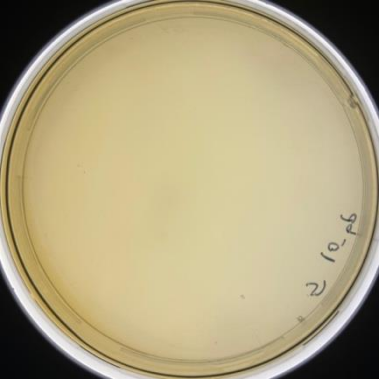
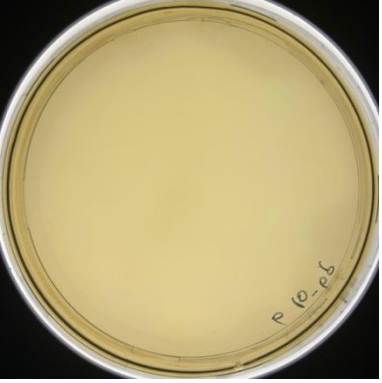
* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^6 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle aittir.

Ek B19 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak 98 µm genlikte ultrases ile elde edilmiş postbiyotiklerin *Bifidobacterium* kültürü üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizi sonucundaki petri görüntüleri.*

Genlik (µm)	İşlem Süresi	a	b
98	30 dk		
	45 dk		
	60 dk		

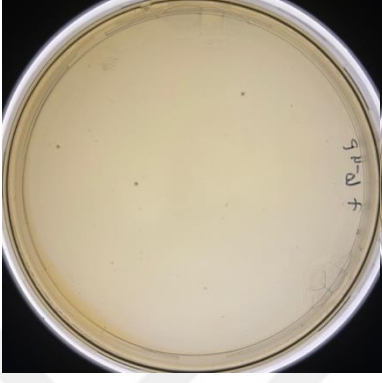
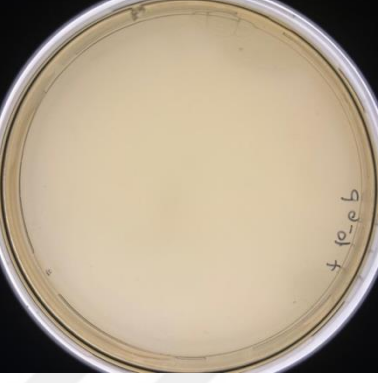
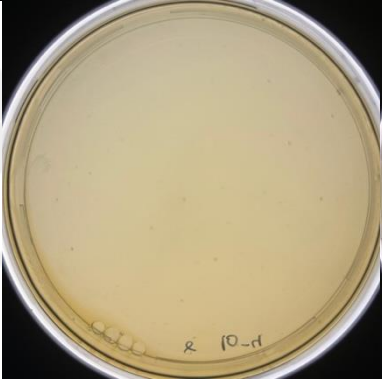
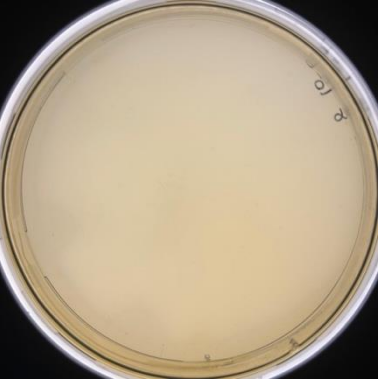
* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklere; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^6 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklere aittir.

Ek B20 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak 172 µm genlikte ultrases ile elde edilmiş postbiyotiklerin *Bifidobacterium* kültürü üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizi sonucundaki petri görüntüleri.*

Genlik (µm)	İşlem Süresi	a	b
172	30 dk		
	45 dk		
	60 dk		

* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklere; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^6 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklere aittir.

Ek B21 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak 246 µm genlikte ultrases ile elde edilmiş postbiyotiklerin *Bifidobacterium* kültürü üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizi sonucundaki petri görüntüleri.*

Genlik (µm)	İşlem Süresi	a	b
246	45 dk		
	60 dk		

* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^6 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle aittir.

Ek B22 *Lactobacillus acidophilus* LA-5 kullanılarak 320 µm genlikte ultrases ile elde edilmiş postbiyotiklerin *Bifidobacterium* kültürü üzerindeki probiyotik geliştirici aktivite analizi sonucundaki petri görüntüleri.*

Genlik (µm)	İşlem Süresi	a	b
246	60 dk		

* Tabloda “a” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler 10^4 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle; “b” olarak belirtilen ve sunulan görüntüler ise 10^6 düzeyinde seyreltilmiş olan örneklerle aittir.