



**MERALARDA BESLENEN İNEKLERİN SÜTLERİNDEN PROBİYOTİK
MİKROORGANİZMANIN İZOLASYONU VE TANIMLANMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Vet. Hek. Hüseyin ÖZCAN

Eskişehir 2022

**MERALARDA BESLENEN İNEKLERİN SÜTLERİNDEN PROBİYOTİK
MİKROORGANİZMANIN İZOLASYONU VE TANIMLANMASI**

Vet. Hek. Hüseyin ÖZCAN

YÜSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yağmur TUNALI

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Kasım 2022

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 2107S117 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Hüseyin Özcan'ın “Meralarda Beslenen İneklerin Sütlerinden Probiyotik Mikroorganizmanın İzolasyonu ve Tanımlanması” başlıklı tezi 15/11/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Yağmur TUNALI	
Üye	: Prof. Dr. Meral YILMAZ CANKILIÇ	
Üye	: Doç. Dr. Hülya KARACA	

Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ
Enstitü Müdürü

ÖZET

MERALARDA BESLENEN İNEKLERİN SÜTLERİNDEN PROBİYOTİK MİKROORGANİZMANIN İZOLASYONU VE TANIMLANMASI

Vet. Hek. Hüseyin ÖZCAN

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kasım 2022

Danışman: Prof. Dr. Yağmur TUNALI

Laktik asit bakterileri (LAB), özellikle süt ve süt ürünleri gibi fermente gıdaların içeriğinde bulunan, gıdalarla tüketilen probiyotik mikroorganizmalardır. Söz konusu çalışmada; Türkiye'nin Eskişehir ili Seyitgazi İlçesindeki meralarda bulunan ve herhangi bir endüstriyel yem tüketmeyen ineklerden elde edilen çiğ süt ürünlerinden LAB'nin izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmıştır. Süt ve süt ürünleri, bakteriyolojik incelemeler için elle sağım yapan üreticilerden toplanmıştır.

Simental ve Montofon inek ırklarına ait toplam dört örnek alınmış ve laktik asit bakteri izolasyonu yapılmıştır. Toplam 30 adet saf laktik asit bakteri izolatu elde edilmiştir. İzolatlara ait seçici besiyeri ortamındaki morfolojik, biyokimyasal özellikler (katalaz testi, tuz toleransları) değerlendirilmiştir. Bazı çevresel fizyolojik (sıcaklık, karbonhidrat fermentasyonu) koşullardaki üreme fizyolojisi ve antibiyotik direnç testleri uygulanmıştır. Yapılan testlerin sonuçlarına göre, ileri testlerle kanıtlanmak üzere bazı probiyotik özellikleri taşıyan potansiyel izolatlar elde edilmiştir.

Türkiye'de doğal sütlerden probiyotik bakteri izolasyonu ve tanımlanması konusunda az sayıda çalışma olması ve endüstriyel yemle beslenmeyen ineklerden alınan çiğ sütte probiyotik bakterilerin izolasyonu ve tanımlanmasına ait bir çalışmaya rastlanılmaması sebebiyle çalışma önem taşımaktadır. Çalışmada elde edilen laktik asit bakteri izolatlarının tür düzeyinde identifikasyonu ve probiyotik özelliklerinin net olarak ortaya konması için ilave testlere gereksinim olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Antimikrobiyal, İnek sütü, Probiyotik.

ABSTRACT

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PROBIOTIC MICROORGANISM FROM THE MILK OF COWS FEEDING IN RANGELAND CHARACTERIZATION OF THE DETERIORATION

Vet. Hüseyin ÖZCAN

Department of Pharmaceutical Microbiology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, November 2022

Supervisor: Prof. Dr. Yağmur TUNALI

Lactic acid bacteria (LAB) are probiotic microorganisms found in fermented foods such as milk and dairy products and consumed with food. In the current study, isolation and characterization of LAB from raw milk products obtained from cows that do not consume any industrial feed and are found in the Seyitgazi District of Eskişehir province of Turkey were performed. Milk and dairy products were collected from hand-milking producers for bacteriological examinations.

A total of four samples belonging to Simmental and Brown Swiss species were taken, and probiotic bacteria were isolated. A total of 30 pure microorganism isolates were obtained, and the morphological and biochemical characteristics (catalase test, salt tolerance) in the selective medium of the isolates were defined. The reproductive physiology under certain environmental physiological (temperature, carbohydrate fermentation) conditions has been investigated. Also, antibiotic resistance tests were performed. According to the results of the tests, it was understood that the isolates obtained were suitable for the probiotic character.

The study is important because there are few studies on the isolation and identification of probiotic bacteria from natural milk in Turkey, and there is no study on the isolation and identification of probiotic species in raw milk taken from cows that are not fed with industrial feed. Additional research is needed on identifying and characterizing probiotic microorganisms at the species level of the study.

Keywords: Antimicrobial, Cow's milk, Probiotic potential.

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimimi tamamlama sürecinde engin tecrübe, bilgi, kaynak ve bilimsel bakış açısını bana cömertçe sunan, her alanda yol gösterici olan ve destekleyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Yağmur Tunalı'ya,

Bu bilimsel çalışmanın ortaya çıktığı her aşamada çalışmaktan çok büyük keyif aldığım, azmini, bilimsel ve akademik bakış açısını takdir ettiğim, yardım ve tecrübelerini benden hiçbir zaman esirgemeyen sevgili hocam Öğr. Gör. Pervin Soyer'e

Lisansüstü eğitim sürecinde bana her türlü çalışma imkanı sunan, bilgi ve birikimlerime katkı sağlayan Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı hocalarıma,

Her alanda olduğu gibi bu bilimsel çalışmanın da ortaya çıkmasında beni destekleyen eşim Araş. Gör. Dr. Saniye Özcan'a, Oğlum Batuhan Özcan'a ve kızım Begüm Özcan'a

Sonsuz minnet ve şükranlarımı sunuyorum.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

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

Hüseyin ÖZCAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	4
2.1. Probiyotikler	4
2.2. Prebiyotik.....	6
2.3. Paraprobiyotik	6
2.4. Postbiyotik	7
2.4.1. Probiyotiklerin doğasında var olan canlılığın ötesinde sağlık yararları: yeni kavramlar olarak postbiyotik ve paraprobiyotikler	8
2.4.2. İşleme ve üretim için laboratuvar teknolojileri.....	9
2.4.3. Probiyotiklerin kullanımları	11
2.4.4. Probiyotiklerin farmakolojisi.....	13
2.4.5. Probiyotikleride dozaj ve ürün seçimi	15
2.4.6. Probiyotiklerin yan etkileri ve güvenlik.....	16
2.4.7. Probiyotiklerin ilaç ile etkileşimleri	17
2.4.8. Önlemler ve kontrendikasyonlar	17

2.4.9. Sınırlamalar	18
2.5. Çiğ İnek Sütünde Probiyotik	18
2.6. Anne Sütünde Probiyotik	20
2.7. Laktik Asit Bakterileri.....	22
3. GEREÇLER	28
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler	28
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	28
3.3. Örneklerin Toplanması	29
3.4. Besiyerleri	29
3.5. Standart Bakteri Suşları.....	30
4. YÖNTEMLER	31
4.1. Çiğ Süt Numunelerinin Temini.....	31
4.2. Çiğ Süt Numunelerinin Dilüsyonu ve LAB İzolasyonu	31
4.3. İzole Edilen Bakterilerin Tanımlanması.....	31
4.3.1. Morfolojik tanımlama.....	31
4.3.2. Biyokimyasal tanımlama	32
4.3.2.1. <i>Katalaz testi</i>	32
4.3.2.2. <i>Tuz toleranslarının belirlenmesi</i>	32
4.3.2.3. <i>Sıcaklık toleranslarının belirlenmesi</i>	32
4.3.2.4. <i>Glikozdan ve laktozdan gaz-asit üretimi</i>	32
4.3.2.5. <i>Antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi</i>	32
4.3.2.6. <i>LAB'nin süpernatantlarının antibakteriyal aktivitelerinin belirlenmesi</i>	33
5. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	34
5.1. Çiğ Sütten LAB İzolasyonu ve Morfolojik Tanımlama.....	34
5.2. Biyokimyasal Tanımlama	36
5.2.1. Katalaz testi	36

5.2.2. Tuz toleranslarının belirlenmesi.....	37
5.2.3. Sıcaklık toleranslarının belirlenmesi.....	38
5.2.4. Glikozdan ve laktozdan gaz-asit üretimi	40
5.2.5. Antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi	41
5.2.6. LAB'nin süpernatantlarının antibakteriyal aktivitelerinin belirlenmesi	43
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	46
ÖZGEÇMİŞ	



TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar [10]	5
Tablo 2.2. Paraprobiyotik ve postbiyotik elde etmek için kullanılan başlıca laboratuvar yöntemleri [24].....	10
Tablo 2.2. (Devam) Paraprobiyotik ve postbiyotik elde etmek için kullanılan başlıca laboratuvar yöntemleri [24]	11
Tablo 2.3. Bazı probiyotiklerin sağlığa yararlı etkileri [9]	12
Tablo 2.4. (Devam) Bazı probiyotiklerin sağlığa yararlı etkileri [9]	13
Tablo 2.5. Anne sütünün besin değerinin çiğ inek sütü ile karşılaştırılması [77, 78]....	21
Tablo 2.6. LAB'ın ayırt edici özellikleri [12]	25
Tablo 3.1. Kullanılan cihazlar, modelleri ve kullanım amaçları.....	28
Tablo 5.1. Her bir izolatın morfolojik özellikleri.....	35
Tablo 5.2. İzolatların farklı tuz konsantrasyonlarındaki toleransları	38
Tablo 5.3. İzolatların farklı sıcaklık oranlarındaki toleransları.....	39
Tablo 5.4. İzolatların farklı karbohidrat içeren besiyerindeki davranışları.....	40
Tablo 5.5. İzolatların farklı antibiyotiklere karşı dirençleri	42
Tablo 5.6. Laktik asit bakteri izolatlarının agar kuyu difüzyon yöntemi ile belirlenen inhibisyon zon çapları (mm)	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Paraprobiyotik ve paraprobiyotik terimlerinin kavramsallaştırılması [24]	9
Şekil 2.2. Bazı aerobik ve fakültatif anaerobik Gram pozitiflerini içeren LAB şematik, köksüz filogenetik ağacı [12]	23
Şekil 5.1. Saf izolatlardan kok görüntüsüne sahip olanlar (100× büyüme oranı)	36
Şekil 5.2. Saf izolatlardan kokobasil görüntüsüne sahip olanlar (100× büyüme oranı). 36	
Şekil 5.3. Saf izolatlardan basil görüntüsüne sahip olanlar (100× büyüme oranı)	36
Şekil 5.4. İzolatların farklı karbohidrat içeren besiyerlerindeki görünüşleri	41
Şekil 5.5. Antibiyotik diskinin inhibisyon zon görüntüleri	42
Şekil 5.6. Antibiyotik disklerinin inhibisyon zon görüntüleri	45

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
IgA	: İmmünoglobulin A
İZ	: İnhibisyon zonları
LAB	: Laktik Asit Bakterileri
LGG	: <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
MAR	: Çoklu antibiyotiğe direnç
MHB	: Muller-Hinton Broth
MRS	: De Man Rogosa ve Sharpe
SDB	: Saboroud Dekstrozu Broth
TSB	: Tryptone Soy Broth

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda, gelişen teknoloji ile birlikte koruyucu ve tedavi edici ürün arayışları nedeniyle probiyotiklere hem araştırma hem de tüketici ilgisi oldukça artmıştır. Artan klinik kanıtlar, özellikle bazı ishalleri hastalıkların tedavisinde probiyotik kullanımıyla ilgili önerilen bazı tedavi yöntemlerini desteklemektedir. Probiyotikler insan ve hayvanlarda normal florada bulunan ve sağlığa pek çok olumlu etkileri olan mikroorganizmalardır. *Bifidobacterium*, *Enterobacterium*, *Lactobacillus* ve *Saccharomyces* türleri insan ve hayvan normal flora bölgelerinde yaşayan önemli mikrobiyom elemanlarından. Probiyotikler enfeksiyonlara karşı konak savunmasında direnci güçlendirerek özellikle bağırsak ve genital sistemde patojen çoğalmasını baskırlar. Sindirime yardımcı olmak, vitamin sentezlemek, safra tuzlarının metabolizasyonu, serum kolesterol seviyesini düşürmek, toksin emilimini engellemek, bağırsak mukoza hücrelerinin ve savunma sistemi hücrelerinin olgunlaşmasına destek sağlamak gibi önemli etkileri vardır. Ayrıca immün sistemi uyarıcı maddeler sentezleyerek alerjileri engelleme, diyareyi kontrol altına almada önemli rol oynarlar. Antimikrobiyal, antikanserojenik ve antioksidatif, antibiyofilm aktivite gibi terapötik özellikleri mevcuttur. Obeziteye karşı koruyucu metabolik denge oluştururlar. Normal doğumla dünyaya gelerek anne sütüyle beslenen bebeklerin bağırsaklarında anneden genital ve laktasyonla kazanılan maternal probiyotik mikroorganizmalar yoğun olarak bulunur. Anne sütündeki kalsiyumun emilimini artırarak bebek gelişimini sağlıklı şekilde hızlandırırlar.

Probiyotiklerin insan sağlığı üzerinde gösterdikleri başlıca yararlar;

1. Gastrointestinal enfeksiyonları kontrol etmesi, antimikrobiyal etki göstermesi,
2. Böbrek rahatsızlıklarını gidermesi,
3. β -galaktosidaz gibi önemli sindirim enzimlerinin üretimi ile birlikte vücutta laktoz kullanımını artırması,
4. Serum kolesterol düzeyini azaltması,
5. Antimutajenik ve kolon kanserinin önlenmesi gibi bazı antikanserojenik aktiviteler göstermesi,
6. Bağışıklık sistemini düzenleyici özellikler sergilemesi, antialerjik fonksiyonlara sahip olması,
7. Besin öğelerinin biyolojik değerini artırması,
8. Vitamin üretimini artırması,

9. Mineral ve iz elementlerden yararlanım arttırması ve
10. Serum kolesterol seviyesini düşürmesi şeklinde sıralanabilir.

Gıdalarla alınan probiyotiklerin sağlığa yararlı etkilerinin ortaya çıkışında özellikle gastrointestinal sistemden geçişe, mide asidi ve barsak safra salgılarına, enzimlerine dirençli hücre yapısına sahip olmalarıdır. Bu özellikleri sayesinde barsak ortamında bağırsak epiteline tutunarak kolonize olarak çoğalabilirler. Probiyotikler bağırsak florasının dengesini stabilize ederek patojenlerin sayıca artışı kontrol altında tutarlar. Ayrıca probiyotik suşlar, özellikle hayvansal kaynaklı probiyotik mikroorganizmalar insanlarda güvenli şekilde kullanılabilirler. Probiyotik içeren ürünlerin raf ömrü boyunca canlılıklarını koruyarak patojenik özellik göstermemeleri büyük avantaj sağlar. Birden fazla organizma içeren probiyotikli ürünler özellikle iki nedenden dolayı çekicidir; 1) bazı hastalarda kolonizasyon bir suşla meydana gelebilir, diğer suş ise kolonizasyon sağlayamayabilir ve 2) probiyotik karışımlar patojenleri baskılamada sinerjik etkili olabilir [1].

Probiyotikler kapsüle edilmiş şekilde kullanılabilirler. Besicilikte gıda katkı ürünleri olarak kullanılan probiyotikler, hayvanların beslenmesi ve mikrobiyal enfeksiyonlardan korunmada ucuz ve güvenli bir yoldur. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Enterobacterium* cinsleri endüstriyel gıda üretim süreçlerinde yaygın şekilde kullanılırlar. *Lactobacillus* suşlarının ürettikleri ekzopolisakkaritler, hayvanlarda süt üretimi sırasında süt içeriğini ve viskozitesini geliştirmek için kullanılabilir. *Lactobacillus* suşları mannitol üretme kabiliyetine sahiptir. Probiyotiklerin önemli bir ekonomik pazar potansiyeli vardır. Probiyotik takviyeli gıda ve yemlerin endüstriyel üretimine ve tüketimine olan ilgi günümüzde artmaktadır. Probiyotik özellikler suşa özgüdür ve hem insanlar hem de hayvanlar için yeni *Lactobacillus* suşlarının endüstriyel probiyotik potansiyellerini araştırma konusunda daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Süt *Lactobacillus* probiyotiklerinin izolasyonunda önemli ve canlı bir gıda kaynağıdır. Probiyotik türler beslenme, yaş ve çevre gibi çeşitli faktörlerden etkilenir [2].

Türkiye'nin farklı bölgelerinde ve diğer ülkelerde üretilen farklı geleneksel süt ürünleri, dünya çapında besin emiliminin iyileştirilmesi, toksinlerin inaktivasyonu ve anti patojenik aktiviteler gibi olumlu katkılar sağlamaktadır.

İnek sütü, ineğin meme bezleri tarafından üretilen soluk bir sıvıdır. Yavru memeliler için diğer yiyecek türlerini sindirmeden önce birincil besin kaynağıdır. Proteinler ve laktoz dahil olmak üzere birçok baēka besin içerir. Ayrıca süt, laktik asit bakterilerinin (LAB) doğal yaēam alanlarındandır. Probiyotikler, gastrointestinal kanalda mikrobiyal dengeyi koruyarak vcoda sağlık açısından fayda sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır. Son yirmi yılda, mide-bağırsak sağlığı, geliēmiē baęıēıklıęa katkıda bulunma gibi sağlığa olumlu etkileri nedeniyle gözler süt ve ürünlerine evrilmiētir. Günümüzde süt endüstrisi, özellikle fermente süt, peynir, yoğurt, tereyağı ve sütlü içecekler probiyotiklerin en yaygın olarak kullanıldığı sektördür. Günümüzde probiyotik dost bakteriler, gıdalardan, peynirden, yoğurttan ve ayrıca insan sütü, bebek kakaları, insan vajinası gibi insanın normal flora bölgelerinden izole edilebilmektedir. Probiyotikler, insanlarda ve hayvan türlerinde sağlığın geliētirilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Antibiyotikle iliēkili veya gezgin diyaresi, huzursuz (irritabl) bağırsak sendromu ve laktoz intoleransından diē çürüklerine, ülserlere, bağırsak motilite bozukluklarına kadar geniē bir yelpazede patolojik durumlarda biyolojik olarak aktif bir ajan olarak kullanılmıēlardır. Ayrıca probiyotikler ve baęıēıklık sistemleri arasındaki etkileēim hakkında çok sayıda bilimsel rapor vardır [3]. alıēmanın amacı, merada doğal olarak beslenen ineklerin sütünden *Lactobacillus* türlerini izole etmek, karakterizasyonunu yaparak bazı probiyotik özelliklerini araētırmaktır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Probiyotikler

Son yıllarda, probiyotik gıda kavramına artan ticari ilginin yanı sıra probiyotiklerle ilgili araştırmalarda da bir artış söz konusudur. Bu eğilim, belli probiyotik organizmaları karakterize etme konusundaki ilerlemelerin yanı sıra, atfedilen sağlık yararlarını doğrulama girişimlerini sağlar. Nispeten yeni bir kelime olmasına rağmen, canlı bakteri içeren bazı gıdaların faydalı etkileri yüzyıllardır bilinmektedir. Bununla birlikte, 20. yüzyılın başlarında araştırmacıların bağırsak florasının zararlı mikropların yerini alan yararlı bakterilerle yeniden düzenlenebilmesi probiyotik kavramının gelişimine katkı sağlamıştır [4, 5]. Probiyotikler, yeterli miktarlarda uygulandığında konakçıya sağlık açısından fayda sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanır [6]. Probiyotiklerin kullanımı; 1900'lerin başında Metchnikoff'un bazı bakterilerin olumlu rolünü gözleyerek; bu yararlı bakterileri zararlı mikroplar ile yer değiştirmede kullanılmasını öne sürmesine dayanır [7]. Yaşam için anlamına gelen probiyotik terimi ilk olarak 1960'larda Lilly ve Stillwell tarafından kullanılmıştır [8].

Probiyotiklerle ilgili bu mevcut tanımlar, probiyotiğin canlı ve tercihen aktif olması gerektiğine vurgu yapmaktadır. Ancak son yıllarda elde edilen bulgular, probiyotiklerin inaktive, cansız ve hatta parçalanmış hücrelerinin bir yandan konakçı üzerinde faydalı etkileri olduğunu, diğer yandan canlı mikrobiyal hücrelerin güvenlik sorunlarına ilişkin endişeler; paraprobiyotikler ve postbiyotikler gibi probiyotik terminolojiye bazı yeni terimlerin dahil edilmesine neden olmuştur. Farklı formlarda inaktif ve cansız probiyotik hücrelerin sağlıklı etkilerine odaklanan bu terimler, çeşitli nedenlerle kafa karıştırıcı ve belirsizdir. Canlı probiyotik hücrelerin ve türevlerinin tüm olası sağlık etkilerini kapsayacak yeni terminolojiye gerçek probiyotik (canlı ve aktif mikrobiyal hücreler), psödoprobiyotik (vejetatif veya spor formlarında canlı ancak aktif olmayan hücre) ve hayalet probiyotik (formlarda cansız hücre, dahil bozulmamış veya yırtılmış) eklenmesi önerilmektedir. Ayrıca probiyotik tanımı içinde, 'konakçı için potansiyel olarak sağlıklı olan canlı veya cansız mikrobiyal hücre (vejetatif veya spor; bozulmamış veya parçalanmış)' tanımlaması tavsiye edilmiştir [9].

Diyet takviyeleri ve gıdalar olarak düzenlenen probiyotikler, maya veya bakterilerden oluşmaktadır. Kapsüller, tabletler, paketler veya tozlar halinde ve en yaygın olarak yoğurt veya süt içecekleri olmak üzere çeşitli fermente gıdalarda

bulunurlar. Probiyotik ürünler, tek bir mikroorganizma veya birkaç türün karışımını içerebilir. En yaygın kullanılan probiyotikler arasındaki LAB, özellikle *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerinden oluşur. **Tablo 2.1**'de probiyotik olarak kullanılan yaygın mikroorganizmalar listelenmiştir. Son zamanlarda bir maya olan *Saccharomyces boulardii*'nin de sağlık yararları olduğu öne sürülmeye başlanmıştır. Probiyotik etkilerin belirli bir türe özgü olma eğiliminde olması dikkate değerdir, bu nedenle bir türe atfedilen bir sağlık yararı, bir tür içinde bile olsa, başka bir tür için geçerli olmayabilir. Bu nedenle potansiyel sağlık yararları hakkında genellemeler yapılmaması önemlidir.

Tablo 2.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar [10]

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Diğer LAB	Diğer türler
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli strain nissle</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. farciminis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. thermophilum</i>		
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

Probiyotikler, küresel fonksiyonel gıda pazarının yüzde 65'inden fazlasını oluşturan yaygın gıdaların içeriğinde başta gelir. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Enterococcus spp.* gibi türler, probiyotik takviyelerinde bulunan canlı formdaki bakteriler arasındadır. Filum *Firmicutes* içinde, LAB çeşitli cinslerden oluşur. LAB; *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* cinslerini içerir [11, 12].

2.2. Prebiyotik

Prebiyotik ilk olarak 1995 yılında Gibson ve Roberfroid tarafından “kolondaki bir veya sınırlı sayıda bakterinin büyümesini ve/veya aktivitesini seçici olarak uyararak konakçıyı faydalı bir şekilde etkileyen ve böylece konakçı sağlığını iyileştiren sindirilemeyen bir gıda bileşeni olarak tanımlanmıştır [13]. Daha sonra ise prebiyotik konak sağlığı üzerinde faydalar sağlayan gastrointestinal mikrobiyotada hem bileşimde hem de aktivitede spesifik değişikliklere izin veren seçici olarak fermente edilmiş bir bileşen” olarak tanımlanmıştır [14]. Bu tanıma göre, aday prebiyotikler, *in vitro* ve son olarak *in vivo* testlerle kanıtlanacak olan belirtilen kriterleri karşılamalıdır. Son yıllarda, konakçıya sağlık ve fayda sağlamak için kolonik mikrobiyotanın kompozisyonunu modüle etmek için fonksiyonel gıdalar olarak prebiyotiklerin kullanımına büyük bir ilgi vardır.

Belirli türler için seçiciliği dışında, diyet lifi tanımıyla aşağı yukarı örtüşmektedir. Bu seçicilik, fruktooligosakkaritler ve inülin, transgalaktosile edilmiş oligosakkaritler ve soya fasulyesi oligosakkaritleri gibi maddelerin yutulmasıyla desteklenebilen *bifidobakteriler* için gösterilmiştir [15]. Fruktooligo- ve polisakkaritlerin bir karışımı olan inülin dışında, bilinen prebiyotikler 3-10 karbohidrat monomerinden oluşan sindirilemeyen oligosakkaritlerin karışımlarıdır. 1980’den beri, oligosakkaritler gıda endüstrisi (içecekler, tatlılar) tarafından viskoziteyi, emülsifikasyon kapasitesini, jel oluşumunu, donma noktasını ve gıdaların rengini değiştirmek için giderek daha fazla kullanılmaktadır. Orta derecede tatlılık (tipik olarak sakaroz değerinin %30-60’ı), düşük karyojeniklik, düşük kalorimetrik değer ve düşük glisemik indeks gibi beslenme ve sağlıkla ilgili özellikler gösterirler [10].

2.3. Paraprobiyotik

2004 yılında probiyotik kavramında beklenmedik değişiklikler yaşanmaya başlamış ve ölü mikroorganizmaların da çeşitli faydalarının olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmeye başlanmıştır. Yapılan çalışmalarda; ısıyla öldürülen *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) hücrelerinin yararlı etkileri, öldürülen hücrelerin, interlökin-8 üretimini azaltma yetenekleri nedeniyle daha etkili inflamatuvar yanıt verdiği, UV ile inaktive edilmiş LGG hücrelerinin bağırsak epitelinde IL-8 üretimini azaltmada etkili olduğu, ısıyla öldürülen laktobasil türlerinin (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus agilis* ve *Lactobacillus casei*) *Salmonella typhi* ve *Escherichia coli*’nin Caco-2

hücrelerine yapışmasını önlemedeki yeteneklerinin değerlendirilmesi gibi sarsıcı sonuçlar alınmıştır [16-18]. 2011 yılında ise Taverniti ve Guglielmetti konağın sağlığına bir fayda sağlamak için inaktive edilmiş mikrobiyal hücreleri veya hücre fraksiyonlarını belirtmek için paraprobiyotik terimini önermiş, tanımın canlı hücrelerle sınırlandırılmasını ve neden revize edilmesi gerektiğini de ayrıntılı olarak açıklamıştır [19]. Yazarlara göre paraprobiyotik (hayalet probiyotikler) terimi, canlı olmayan mikrobiyal hücreler (sağlam veya kırık) veya ham hücre ekstraktları (yani karmaşık kimyasal bileşime sahip) olarak ifade edilmelidir. Mikrobiyal kökenli saflaştırılmış moleküller veya saf mikrobiyal hücre ürünleri, kullanımlarının geleneksel farmasötik metodolojilere dahil edilmesi gerektiğinden paraprobiyotik kavramından çıkarılmıştır. Ek olarak, bir sağlık yararı gösterildiğinde, bir ürünün paraprobiyotik kategorisine atanması, ısıtma işlemi, deaktivasyon, kimyasal veya mekanik bozulma, basınç, liofilizasyon veya asit deaktivasyonu, γ veya UV ışını dahil olmak üzere fiziksel veya kimyasal stratejiler kullanılarak elde edilebilen mikrobiyal hücre inaktivasyonu için kullanılan yöntemlerden etkilenmemelidir. Bu tanıma göre hem ince hem de sağlam hücreler paraprobiyotik olarak kabul edilir ki bu da bu tanımın kafa karıştıran noktalarından biridir. Probiyotiklerin hücresel ekstraktlarının paraprobiyotik tanımına faydalı bir faktör olarak girmesi de kafa karıştıran başka bir noktadır [9].

Sonuç olarak, yeni paraprobiyotik tanımına dahil edilen, mikrobiyal kaynaklı cansız materyal olan müstahzarların, insan/hayvan sağlığını olumlu yönde etkilediği ve probiyotiklere göre daha güvenli, kararlı ürünler ve daha fazlasının üretilmesine olanak sağlaması gibi belirgin bir avantaja sahip oldukları gösterilmiştir. Paraprobiyotikler popülerlik kazanmaktadır ve gelecekte gıda, takviye, ilaç ve yemlerde yaygın olarak kullanılacaktır [19].

2.4. Postbiyotik

Paraprobiyotik terimi esas olarak tüm inaktive hücreler, zar veya hücre duvarı bileşenlerini vurgularken, postbiyotik, 50-100 kDa moleküler ağırlıkta çözünür olan cansız probiyotiklerin özü olarak tanımlanmaktadır. Genel olarak, uygun bir durumda bulunan probiyotikler, postbiyotikler üretebilir. Postbiyotik aynı zamanda hücre içermeyen süpernatantlar, biyojenikler, metabolitler ve probiyotik aktivitenin metabolik atığı olarak da tanımlanır. 2013 yılında Tsilingiri ve ark. postbiyotik, probiyotiklerin metabolitlerinden, konakçıya doğrudan yada dolaylı olarak sağlık yararları sunan

herhangi bir ekstrakte edilmiş veya salgılanmış molekülden elde edilen herhangi bir etki olarak tanımlamıştır [20]. Bu çözünür bileşikler arasında enzimler, ekzo ve endo polisakaritler, yüzey proteinleri, vitaminler, organik asitler, yağ asitleri ve peptitler yer alır [9].

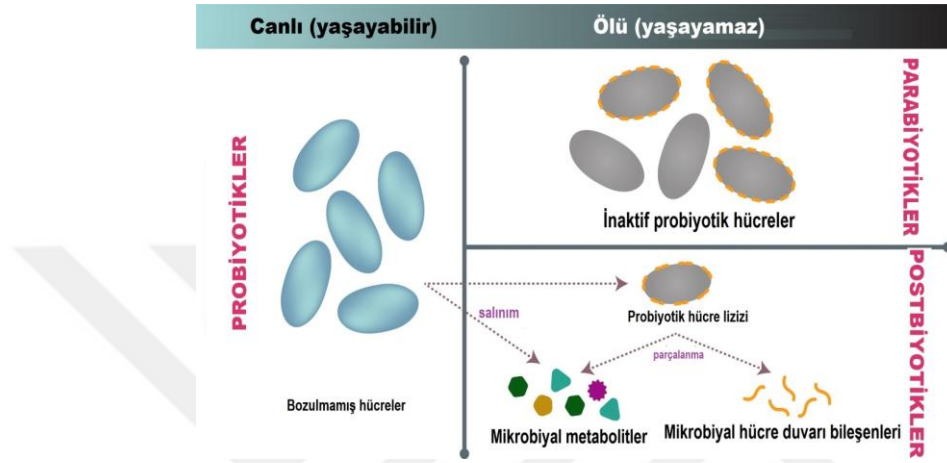
Orijinal tanımına göre, postbiyotikler, konakçı için kanıtlanmış yararı olan (sağlık yararlarını kapsayacak) iyi tanımlanmış molekül karışımlarıdır ve inaktive edilmiş hücreleri içermez. İnaktive edilmiş ve/veya ölü mikroorganizmaların kullanımı, sinerjik veya ek olarak etkileşime girebilecek çok sayıda moleküler faktörden kaynaklanan sağlık yararları anlamına gelir. Bu yön, geleneksel probiyotikler için de geçerlidir. Bu nedenle, mikrobiyal kökenli iyi tanımlanmış moleküler faktörleri, sağlığı geliştirici özellikleri bilinen mikrobiyal hücrelerden (postbiyotikler) türetilen karmaşık matrislerin kullanımından ayırt etmek için bilimsel bir ihtiyacın var olduğu düşünülmektedir [21].

Literatürlerin çoğu, postbiyotiklerin terminolojisinden ziyade postbiyotiklerin doğasını ve yararlı etkilerini tartışmaktadır. Post ön eki kelimenin tam anlamıyla sonra anlamına ve postbiyotik yaşamdan sonra anlamına gelmektedir. Dolayısıyla mikrobiyal hücrelerin (cansız hücreler) canlılığından sonra kastedildiyse, anlam paraprobiyotik ile karıştırılmıştır, çünkü her iki durum da canlılığın ötesindedir. Ayrıca postbiyotik için bahsedilen fonksiyonların sadece ölü hücrelerle ilgili olmadığını ve sağlığı geliştirici bu bileşenlerin canlı hücrelerden de elde edilebileceğinin altı çizilmelidir. Bu nedenle anlam olarak postbiyotik, paraprobiyotik kadar kafa karıştırıcı ve belirsizdir [9, 22]. Tsilingiri ve Rescigno [20] konakçı üzerinde doğrudan veya dolaylı olarak faydalı olan herhangi bir madde (bakteri metabolitleri, hücre ekstraksiyonu veya probiyotik organizma ile salgılanan molekül/moleküller) için postbiyotik önermiştir; bu iki bilim insanının tanımladığı işlevselliğe göre bu terimde seçilmesi uygun değildir [9, 23].

2.4.1. Probiyotiklerin doğasında var olan canlılığın ötesinde sağlık yararları: yeni kavramlar olarak postbiyotik ve paraprobiyotikler

Sonuç olarak Şekil 2.1’de verildiği gibi postbiyotik ve paraprobiyotik kavramlarını tanımlarını sınırlayarak ayırt etmek önemlidir. Postbiyotikler, canlı bakteriler tarafından salgılanan veya konakçıya olumlu etki sağlayabilecek bakterilerden sonra salınan çözünür faktörlerdir (ürünler veya metabolik yan ürünler). Ek olarak, postbiyotikler metabiyotikler, biyojenikler, metabolitler ve/veya hücresiz süpernatantlar/özütler olarak ifade edilebilir. Tersine, paraprobiyotikler, yeterli

miktarlarda uygulandığında tüketicilere fayda sağlayan etkisizleştirilmiş (canlı olmayan) mikrobiyal bozulmamış hücrelerdir. Benzer şekilde, paraprobiyotikler canlı olmayan probiyotikler, inaktive edilmiş probiyotikler veya hayalet probiyotikler olarak adlandırılır. Yukarıda belirtilenler göz önüne alındığında paraprobiyotik ve postbiyotikler biyolojik yanıt değiştirici ajanların yeni kategorilerini temsil eder [24].



Şekil 2.1. Paraprobiyotik ve paraprobiyotik terimlerinin kavramsallaştırılması [24]

2.4.2. İşleme ve üretim için laboratuvar teknolojileri

Pratik olarak postbiyotikler ve paraprobiyotikler, gıda ve farmasötik uygulamalar için, türetildikleri canlı mikroorganizmadan daha kararlı ve daha güvenlidir. Çünkü canlılıkları tüketim veya büyük ölçekli üretim sırasında gerekli değildir [25]. Bu nedenle postbiyotikler ve paraprobiyotikler elde etmek için kullanılan teknoloji, mikroorganizmada canlılık kaybını indüklemeye odaklanır. **Tablo 2.2'**de ısı, yüksek basınç, sonikasyon dahil olmak üzere bu amaçlar için yaygın olarak kullanılan birkaç yöntemi göstermektedir. Genel olarak, paraprobiyotikler için, canlı mikroorganizmalardan canlılık kaybı, mikrobiyal hücre yapısını değiştiren faktörlere (örn., DNA kırılması, hücre zarf hasarı) ve/veya fizyolojik işlevlerindeki değişime (örn., anahtar enzimlerin inaktivasyonu) maruz kaldıktan sonra yani hücrenin sağlam yapısını korumak için gerekli olan bakteri zarını ve hücre duvarını bozmadan membran seçiciliğinin devre dışı bırakılması sağlanır. Bunun yerine, hücre içi postbiyotikler için, hücre içi metabolitleri ve/veya hücre duvarı bileşenlerini fragmanlar halinde elde etmek amacıyla en az iki tedavinin bir kombinasyonunu uygulayarak bakteri zarını bozmak gerekmektedir. Bununla birlikte, bazı durumlarda ortaya çıkan karışım, uygulanan

tedavi ve koşullara bağlı olarak aynı anda paraprobiyotikleri ve postbiyotikleri içerebilir. Bu nedenle, bozulmamış hücreleri ortadan kaldırmak ve yalnızca postbiyotik fraksiyonu kurtarmak için mikrofiltrasyon gibi ek adımlar gereklidir. Bu arada, canlı hücreler tarafından salgılanan postbiyotikler için, bunların süpernatantlardan geri kazanılmasında gerekli yöntemler veya teknoloji, temel olarak canlı hücrelerin santrifüjleme ve/veya filtrasyon yoluyla ortamdan çıkarılmasına dayanır [24, 26].

Tablo 2.2. Paraprobiyotik ve postbiyotik elde etmek için kullanılan başlıca laboratuvar yöntemleri [24]

Metot	Amaç	Koşullar	Kaynak
Parabiyotikler			
Isı (termizasyon, pastörizasyon, sterilizasyon)	Hücre zarında hasar, protein denatürasyonu ve enzim inaktivasyonu	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FPTB16 ve <i>Bacillus subtilis</i> FPTB1 (60 °C’de 2 s)	[25]
		<i>Bifidobacterium. longum</i> BR-10 (105 °C’de 20 dk)	[27]
		<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 23272 (8,05 Gy’de 20 s boyunca Kobalt 60)	[28]
Radyasyon (iyonlaştırıcı ve UV ışınları)	Protein denatürasyonu ve nükleik asitlerde hasar	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG, <i>Bifidobacterium breve</i> (Bb1, Bb2) (UV ışınında 20 dk)	[29]
		<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 53103	[30]
Yüksek basınç	Hücre yapısında hasar	(10 dk 37 °C’de 400 veya 600 MPa)	[30]
Sonikasyon	Hücre yapısında hasar	<i>Bifidobacterium longum</i> SPM1207 (5 dk sonikasyon)	[31]
Postbiyotikler			
Sonikasyon/ Enzimatik	Hücre yapısının bozulması	<i>Lactobacillus casei</i> CRL 431 (30 dk/42 kHz için sonikasyon; lizozim/mutanolizin, 1 mg/ mL, 37 °C, 150 dakika)	[32]
		<i>Bifidobacterium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Issatchenkia</i> , <i>Lactobacillus</i>	
Sonikasyon/ Kimyasal	Hücre yapısının bozulması	<i>actobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> ve <i>Saccharomyces</i> suşlar (2 dk/0,5 M etanolik potasyum hidroksit çözeltisi için 300 W’da sonikasyon)	[33]

Tablo 2.3. (Devam) *Paraprobiyotik ve postbiyotik elde etmek için kullanılan başlıca laboratuvar yöntemleri [24]*

Metot	Amaç	Koşullar	Kaynak
Isı/Sonikasyon	Hücre yapısının bozulması	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	[34]
		(40 dk 100 °C/50 W'da 10 dk sonikasyon)	
Yüksek basınç	Hücre yapısının bozulması	<i>Lactobacillus fermentum</i> BGHV110 (Fransız basını, üç pasaj)	[35]

Postbiyotiklerin ve paraprobiyotiklerin üretimi laboratuvar ölçeğinde veya küçük ölçekli üretim altında mümkün olsa da işleme koşullarındaki bir değişiklik veya ölçekleme nedeniyle endüstriyel seviyelerde kısıtlamalar meydana gelebilir. Bu da yapısal değişikliklere ve postbiyotiklerin ve/veya paraprobiyotiklerin fizyolojik işlevinde farklılıklara yol açabilir. Postbiyotiklerin ve paraprobiyotiklerin stabilitesi ve biyoaktiviteleri ile ilgili endüstriyel süreçlerin gereksinimlerini belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu aşikardır.

2.4.3. Probiyotiklerin kullanımları

Probiyotikler, çeşitli tıbbi durumların önlenmesi, tedavisi için ve genel sağlığı desteklemek için kullanılmaktadır. Bazı yararlı sağlık etkileri doğrulanmış, diğer kullanımları ise sınırlı kanıtlarla desteklenmektedir. Sadece probiyotik etkiler suşa özgü olmakla kalmayıp probiyotik ürünler birbirinden farklılık gösterebilir. Canlı mikroorganizmaların kalite kontrolünün karmaşıklığı nedeniyle bir probiyotik diğerine kıyasla daha büyük faydalar gösterebilir. Ayrıca, kombine formdaki ajanlar klinik faydaları ölçmeyi zorlaştırabilir.

Bazı probiyotiklerin genel olarak sağlığa faydaları **Tablo 2.3'**de verilmiştir. Özellikle gastrointestinal sistemle ilişkili hastalıkların tedavisi konusunda bağırsak florasını sağlıklı şekilde yenileme yetenekleri nedeniyle probiyotikler ortak hedef noktadır. Probiyotik kullanımına ilişkin en güçlü kanıt, özellikle çocuklarda *Rotavirus* ishali olmak üzere bazı ishalleri hastalıkların tedavisidir. Klinik çalışmalar, poşit (iltihaplı barsak hastalığı) tedavisinde probiyotiklerin rolünü de desteklemiştir. Antibiyotiğe bağlı diyare ve gezgin diyare için probiyotiklerin etkinliğine ilişkin veriler tutarsızdır. Klinik çalışma sonuçları çelişkili olsa da probiyotik tedavisi ayrıca Crohn hastalığı, ülseratif kolit, irritabl bağırsak sendromu ve *Helicobacter pylori* enfeksiyonlarının tedavisinde

faydalı olabilir. Probiyotiklerin ayrıca laktoz intoleransı semptomlarını azalttığı gösterilmiştir. Çeşitli ürogenital hastalıklar (örneğin bakteriyel vajinoz, kandidal vajinit, idrar yolu enfeksiyonları) dahil olmak üzere, gastrointestinal sistem veya bağırsak mikrobiyotası ile ilişkili olmayan diğer hastalıklar da probiyotiklere yanıt verebilir. Ayrıca; probiyotikler üst solunum yolu enfeksiyonlarının (örneğin, akut otitis media) tedavisi; kolon ve mesane kanseri, alerjik hastalıklar ve atopi riskini azaltma; bağışıklık tepkisini artırma ve diş çürüklerini önlemedeki rolleri de incelenmiştir [36].

Tablo 2.4. Bazı probiyotiklerin sağlığa yararlı etkileri [9]

Probiyotik suşlar	Etki yeri/yerleri	Sağlığa faydaları	Kaynak
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Gastrointestinal sistem	Epitel hücrelerine bağlı kalır, Kolonda IL-10 üretimini artırır	[37]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Beyin	Prefrontal kortekste dopamin ve serotonin konsantrasyonundaki artış	[38]
		Kolonda IL-10 üretimini artırır	
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Kan ve beyin	Plazmada IL-10 konsantrasyonunu artırır	
		Hipokampusta serotonin ve NE seviyelerinin konsantrasyonunu ve BDNF ekspresyonunu artırır	[39]
		Epitel hücrelerine yapışma	
		Laktik asit üretimi	
		Epitel hücre yenilenmesini iyileştirme	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Gastrointestinal sistem	Aflatoksin B1'e bağlanma,	
		Plazmanın CORT artırır	[17]
	Beyin	Kortikal bölgelerde GABA reseptörleri ekspresyonunu artırır	
		Amigdala, hipokampus ve locus coeruleus'ta GABA reseptör ekspresyonunu azaltır	
		Bakteriyel translokasyonun inhibisyonu	
		MUC-gen ifadesini artırır	
		Kolesterole bağlanma	
<i>Lactobacillus casei</i>	Gut	Kolesterol misel oluşumunun inhibisyonu	[19, 40,
		TLR reseptörleri ile etkileşim	41]
		Miyeloperoksidaz ve interlökin aktivitesinin önleme	
		NK hücrelerinin aktivitesini geliştirme	

Tablo 2.5. (Devam) Bazı probiyotiklerin sağlığa yararlı etkileri [9]

Probiyotik suşlar	Etki yeri/yerleri	Sağlığa faydaları	Kaynak
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Gut	Kolesterole bağlılık Kolesterol misel oluşumunun inhibisyonu	[42]
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Kemik	Enflamatuvar sitokinlerin azaltılması Osteopro-tegerin üretimini geliştirme	[43]
<i>Bifidobacterium longum</i>	Gut	Aflatoksin B1'e bağlanma	[18]
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Gut	Aflatoksin B2'ye bağlanma	[18]
<i>Bifidobacterium animalis</i>	Gut	Bağırsak hareketliliğini artırma Safr tuzlarını hidrolize etme	[44]
<i>Saccharomyces boullardii</i>	Gut	T-hücresinin yeniden dağıtımına	[44]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Gut	Patojenlerin translokasyonunu azaltma Patojenik hücrelerin yapışmasını engelleme	[45]
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Gut	Kanser hücrelerinin apoptotik özelliklerini geliştirme	[46]
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Gut	Konak bağışıklık sisteminin uyarma	[47]
<i>Lactococcus lactis</i>	Barsak	H ₂ S üreten mikroorganizmaların büyümesinin baskılama	[48]
<i>Lactobacillus salivarius</i>	Gastrointestinal sistem	Düşük moleküler ağırlıklı bakteriyosinlerin salgılanması	[49]
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Gastrointestinal sistem	Reuterin üretimi (3-hidroksipropionaldehit)	[50]
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ve <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Gastrointestinal sistem Vajina	Patojenler için temel elementlere bağlanma	[51]

2.4.4. Probiyotiklerin farmakolojisi

Probiyotiklerin kesin etki mekanizmaları bilinmemekle birlikte, birkaç hipotez ortaya konulmuştur. Bunlardan birisi; *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerinin; bağırsak pH'sını düşüren ve çeşitli patojenik bakterilerin büyümesini baskılayan, böylece bağırsak florasının dengesini yeniden kuran laktik asit, asetik asit ve propiyonik

asit üretmesidir [52]. Bakteriyel interferensin bir diğer mekanizması, hidrojen peroksit, organik asitler, bakteriyosinler ve biyosüpfaktanlar gibi patojenik mikroorganizmalar için toksik çeşitli maddelerin üretimidir. Bu yeteneğe sahip bir probiyotik, *Lactobacillus* türlerinden geniş bir Gram-pozitif, Gram-negatif ve anaerobik bakteri spektrumunu inhibe eden düşük moleküler ağırlıklı bir bileşik salgıladığı gösterilen suş GG'dir [53]. Ek olarak, patojenik olmayan bir maya olan *S. boulardii*, *C. difficile* tip A ve B'nin toksisitesini azaltan bir proteaz üreterek *Clostridium difficile* enfeksiyonunda rol oynayabilir [36, 54].

Probiyotikler, patojenik organizmaların mukoza epiteline yapışmalarını rekabetçi şekilde bloke ederek idrar ve bağırsak yollarında olumsuz kolonizasyonunu azaltır. Laktobasillerin; *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa*'nın üroepitelyal hücrelere ve bağırsak epitel hücrelerine bağlanmasını engellediği gösterilmiştir. Bu inhibisyon, laktobasillerin sterik engellemeye neden olması ve epitel hücreleri tarafından üretilen yüksek moleküler ağırlıklı glikoproteinler olan bağırsak müsinlerini arttırmasıyla oluşabilir. Bu şekilde bağırsakta koruyucu bir bariyer oluşur. Ayrıca laktobasiller, epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantıları stabilize ederek ve bağırsak geçirgenliğini azaltarak bağırsak mukozal bariyerini güçlendirir [52, 55].

Probiyotiklerin önerilen başka bir etki mekanizması, immünomodülasyondur. *In vivo* çalışmalar, bazı probiyotik suşların, lenfositlerin ve makrofajların fagositik aktivitesini uyararak bağışıklık tepkisini artırdığını göstermiştir. Probiyotikler ayrıca immünoglobulin A'yı (IgA) arttırır ve mononükleer hücreler tarafından sitokin üretimini uyarır [56].

Antimikrobiyal aktivite, safra tuzları, asit toleransı, kullanılacak bakterilerin probiyotik potansiyelini taramak için üç önemli özelliktir. Gıda ürünlerindeki antimikrobiyal bileşikler, patojenik bakterilerin metabolizmasını veya toksinlerini etkilemesi, patojenik mikroorganizmalarla rekabet edebilmesi veya engellemesi amacıyla probiyotik bakterilerden hazırlanır. Probiyotiklerin süt ürünlerinde zararlı bakterilere karşı koruyucu etkileri vardır. Probiyotikler, laktik fermantasyon sırasında organik asitler ve yağ asitleri gibi antifungal bileşikler üretir. Bakteriyosin üreten suşlar biyokoruyucu olarak kullanılır [57]. Çok sayıda sağlık problemlerinin yetersiz probiyotik alımı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir[58].

2.4.5. Probiyotikleride dozaj ve ürün seçimi

Probiyotikler, takviyeler (tabletler, kapsüller veya tozlar) ve fermente süt ürünleri (yoğurt, peynir) olarak mevcuttur. Etkinlikleri, mide-bağırsak yolundan geçişte hayatta kalma ve bir doku bölümünü kolonize etme yeteneklerine dayanır. Mide asidi ve bağırsak safra tuzları tarafından tahribatı önlemek için bazı probiyotik preparatlar enterik kaplı veya mikrokapsüllü olabilir. Kolonizasyonun gerçekleşmesi için probiyotiklerin canlı olması ve etkili konsantrasyonları korumak için düzenli olarak yutulması gerekir. Ne yazık ki, üretim süreci (dekontaminasyon işlemleri) canlı organizmaların cansız hale gelmesine neden olarak probiyotik etkinliğini azaltabilir. Probiyotiklerdeki bakteri veya maya miktarı, kalitesi ve saflığı, canlı mikroorganizmalar ile kalite kontrolünün karmaşıklığı ve evrensel kalite güvence programlarının eksikliği nedeniyle ürünler arasında farklılık gösterebilir.

Probiyotik dozu, ürüne ve spesifik amaca bağlı olarak değişir. Bilimsel literatürde, insan sağlığına fayda sağlamak amacı ile nihai ürünlerdeki 10^6 - 10^7 kob/g'lık popülasyonlar, işlenmiş gıdalardaki 10^8 - 10^9 kob/g'a ulaşan, günlük 100 g veya 100 mL gıda tüketimi ile sağlanan terapötik miktarlar probiyotik kültürler olarak belirlenir. Türk Gıda Kodeksinin Gıda Maddelerinin Genel Etiketleme ve Beslenme Yönünden Etiketleme Kuralları Tebliği kapsamında probiyotik gıda içerisinde raf ömrü sonuna kadar yeterli miktarda canlı probiyotik mikroorganizma ($1,0 \times 10^6$ kob/g) bulunduran ve bu canlılığı muhafaza eden ürün olması gerektiğini belirtir [59]. Tipik olarak bir probiyotik ürün yeterli bağırsak kolonizasyonu olasılığını artırmak için birkaç milyar mikroorganizma içermelidir. Ürünler bazen soğuk muhafaza gerektirebileceğinden, üreticinin tavsiyelerine göre saklanmalıdır. Ayrıca müstahzarların sınırlı bir raf ömrü olabilir ve birçok müstahzar birkaç farklı probiyotik tür içerir, bu nedenle doz ürüne bağlı olarak değişebilir.

2.4.6. Probiyotiklerin yan etkileri ve güvenlik

Oral olarak alındığında probiyotikler genellikle güvenli ve iyi tolere edilir olarak kabul edilir. En yaygın yan etkiler şişkinlik ve gazdır; bununla birlikte, bu bulgular tipik olarak hafiftir ve sürekli kullanımla azalır. Kabızlık ve artan susuzluk da nadiren *S. boulardii* ile ilişkilendirilmiştir. Probiyotiklerle ilgili teorik kaygılardan biri, bu canlı organizmaların mide-bağırsak sisteminden hareket etme potansiyeli ve sistemik enfeksiyonlara neden olmasıdır. Nadir olmakla birlikte, probiyotikle ilişkili bakteriyemi ve fungemi rapor edilmiştir. Yutulan laktobasil probiyotiklerinden bakteriyemi geliştirme riskinin 1 milyon kullanıcıda 1'den az olduğu ve *S. boulardii*'den fungemi gelişme riskinin şu anda 1 milyon kullanıcıda ve kullanıcı başına 1 adet olduğu tahmin edilmektedir. Probiyotiklerle ilgili bir başka teorik risk, antibiyotik direncinin probiyotik suşlardan patojenik bakterilere olası transferi olasılığıdır. Ancak bu henüz gözlemlenmemiştir [60, 61].

Klinik çalışmalarda ciddi bir yan etki tanımlanmamasına rağmen, izole raporlarda spesifik probiyotiklerle ilişkili sistemik enfeksiyonlar kaydedilmiştir. Bunlara laktobasil ile sepsis veya endokardit, *S. boulardii* ile fungemi ve LGG ile karaciğer apsesi dahildir. Laktobasil nedeniyle bakteriyemi nadiren görülür. Ancak predispozan faktörler arasında immünosupresyon, önceden hastaneye yatış, ciddi altta yatan komorbidite (yan hastalıklar), uzun antibiyotik tedavisi ve önceki cerrahi tedaviler yer alır. *S. boulardii* kullanımıyla ilişkili belgelenmiş birkaç fungemi vakası vardır. En büyük risk altında olanlar; kritik derecede hasta veya yüksek düzeyde bağışıklığı baskılanmış hastalar veya mevcut santral venöz kateterleri olan hastalardır. Nazogastrik tüp yoluyla uygulama için yatak başında *S. boulardii* kapsülleri açıldığında, santral venöz kateterler kontamine olabilir ve organizma için giriş kaynağı görevi görebilir. Nadiren laktobasilemi ve fungemi raporları olmasına rağmen; bugüne kadar probiyotik kullanımı ile ilişkili bifidobakteriyel sepsis bildirimi olmamıştır. Neyse ki, probiyotik bakteriyemi veya fungemi vakalarının çoğu uygun antibiyotik veya antifungal tedaviye iyi yanıt vermiştir [36, 62].

Probiyotik ilişkili sepsis için majör ve minör risk faktörlerin belirlendiği çalışmalara bakıldığında başlıca risk faktörleri arasında immünosupresyon (zayıf bir durum veya malignite dahil) ve prematüre bebekler yer almaktadır. Minör risk faktörleri; santral venöz kateter varlığı, bağırsak epitel bariyerinin bozulması (ishal hastalığı gibi), kalp kapak hastalığı (yalnızca *Lactobacillus* probiyotikler), probiyotiğin

dirençli olduğu geniş spektrumlu antibiyotiklerle eşzamanlı uygulama ve probiyotiklerin bir jejunostomi tüpü yoluyla uygulanmasıdır. Jejunostomi midenin asidik içeriğini atlayarak bağırsağa ulaşan canlı probiyotik organizmaların sayısını artırabilir. Araştırmacılar majör risk faktörü veya birden fazla minör risk faktörü olan hastalarda probiyotiklerin dikkatli kullanılmasını önermiştir [62].

Yutulan probiyotiklerden enfeksiyon geliştirme riskinin, özellikle genel olarak sağlıklı bireyler tarafından kullanıldığında çok düşük olduğunu hatırlatmakta fayda vardır. Finlandiya’da, LGG 1990’dan beri süt ürünlerine rutin olarak eklenmiştir. 1995’ten 2000’e kadar LGG içeren ürünlerin tüketiminde önemli bir artış olmasına rağmen; 1990 gözetim döneminde gözlemlenen *Lactobacillus* ile ilişkili bakteriyemi insidansında önemli bir değişiklik olmamıştır [63]. Ayrıca yakın tarihli bir çalışma, ciddi akut pankreatit tahmini olan hastalarda enfeksiyöz komplikasyonları önlemek için probiyotikler kullanıldığında mortalite riskinin arttığını bulmuştur [64].

2.4.7. Probiyotiklerin ilaç ile etkileşimleri

Probiyotikler canlı mikroorganizmalar içerdiğinden, antibiyotiklerin eşzamanlı uygulanması, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerinin etkinliğini azaltarak çok sayıda mikroorganizmayı öldürebilir. Antibiyotik uygulamaları bu bakteri türevli probiyotik alımıyla en az iki saat aralıklı olmalıdır. Benzer şekilde, *S. boulardii* antifungallerle etkileşime girerek bu probiyotiğin etkinliğini azaltabilir. Örneğin; Florastor üreticisinin önerisine göre *S. boulardii* içeren ürünler herhangi bir oral sistemik antifungal ürünle birlikte alınmamalıdır. Probiyotikler; siklosporin, takrolimus, azatioprin ve kemoterapötik ajanlar gibi immünosupresan alan bağışıklığı baskılanmış hastalarda da dikkatli kullanılmalıdır. Çünkü probiyotikler bu tip hastalarda enfeksiyona veya patojenik kolonizasyona neden olabilir [36].

2.4.8. Önlemler ve kontrendikasyonlar

Probiyotikler canlı mikroorganizmalar içerdiğinden, probiyotikli preparatların özellikle kritik hastalığı olan veya ciddi şekilde bağışıklığı baskılanmış hastalarda patolojik enfeksiyona neden olma olasılığı çok düşüktür. *Lactobacillus*’un probiyotik suşlarının, kısa barsak sendromlu hastalarda, muhtemelen farklı bağırsak bütünlüğü nedeniyle bakteriyemiye neden olduğu da bildirilmiştir. Fungemiye yol açan kontaminasyon ve santral venöz kateterleri olan hastalarda da dikkatli olunmalıdır.

Saccharomyces kapsülleri açıldığında ve yatak başında uygulandığında fungemi durumu bildirilmiştir. *Lactobacillus* preparatları, laktoza veya süte aşırı duyarlılığı olan kişilerde kontrendikedir. *S. boulardii*, maya alerjisi olan hastalarda kontrendikedir. Çoğu türün patojenik ve toksik olmadığı düşünüldüğünden, bifidobakteriler için herhangi bir kontrendikasyon bildirilmemiştir [36].

2.4.9. Sınırlamalar

Probiyotikler, diyet takviyeleri olarak düzenlenir ve ilaçlarla aynı katı standartlara tabi değildir. Bu ürünlerle ilgili zorluk; canlı mikroorganizmalarla kalite kontrolünün karmaşıklığını içerir. Sonuç olarak, bireyler etkisiz olan veya değişen miktarlarda bakteri veya maya içeren bir ürün kullanabilirler. Probiyotikleri içeren yayınlanmış çalışmalarda genellikle küçük araştırma grupları kullanılmış ve uygun randomizasyon veya kontrol grupları kullanılmamıştır. Bu nedenle, birçok probiyotik çalışmanın sonuçları, metodolojik sınırlamalar nedeniyle dikkatli bir şekilde yorumlanmalıdır. Farklı probiyotik dozları, suşları, tedavi süreleri ve hasta popülasyonları kullanılmış olabileceğinden çalışmalar arasında heterojenlik durumu mevcuttur. Probiyotik etkiler belirli bir suşa özgü olduğundan, özellikle suş tanımları sağlanmadıysa, sonuçlar yorumlarken bunun önemli etkileri olabilir. Gelecekteki araştırmaların, probiyotiklerin etkinliğini daha iyi değerlendirmek için daha büyük popülasyonlarda ve daha uzun sürelerde daha iyi tasarlanmış klinik denemeleri içermesi gerekir [65].

2.5. Çiğ İnek Sütünde Probiyotik

Son yirmi yılda, insanlardan izole edilen probiyotik bakterileri içeren süt ürünlerinin tüketiminde dünya çapında bir artış olmuştur. Ürünün organoleptik özelliklerine belirli bir miktar dikkat gösterilmesine rağmen, probiyotik bakterilerle ilgili yayınların çoğu insan sağlığı yönüne odaklanmıştır. Fonksiyonel probiyotik ürünlerin tüketimini teşvik etmede başarılı olmak için gıda endüstrisi, tüketicinin taleplerini karşılamalıdır. Tüm probiyotik gıdalar güvenli olmalı ve iyi duyuşsal özelliklere sahip olmalıdır. Son zamanlarda gözden geçirilen güvenlik konuları; insan kaynaklı, patojenik olmama ve antibiyotik direnç özellikleri gibi özellikleri içerir. Sütte bu suşların üremesi ve metabolizması hakkında çok az bilgi mevcuttur. Organik asitlerin ve uçucu bileşiklerin üretimi, ürünün lezzetini ve kıvamını ve dolayısıyla ürünün organoleptik kalitesini doğrudan etkiler [66].

Çiğ sütlerin mikrobiyal florasındaki çeşitlilik, çiğ süt peynirleri arasında organoleptik özelliklerdeki büyük farklılıklara katkıda bulunur. Aslında, tüketiciler tarafından istenen özelliklerin çoğu pastörize peynirlerde bulunmasa da çiğ sütlerin mikrobiyal florasının karakterizasyonunu ele alan az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bugüne kadar tanımlama, kısmi tanımlama ile en çok temsil edilen mikrobiyolojik grupların numaralandırılmasıyla sınırlandırılmıştır. Kısaca, çiğ sütün baskın mikroflorası genellikle (i) laktik asit bakteri türleri; *Lactococcus* ve *Lactobacillus spp.*, (ii) *Pseudomonas spp.*, (iii) *Micrococcaceae* (*Micrococcus* ve *Staphylococcus spp.*) grubu ve (iv) mayalardan oluşur. Çiğ sütlerde bulunan diğer mikrobiyal gruplar *Leuconostoc*, *Enterococcus* ve *Streptococcus spp.*, ayrıca birçok Gram negatif (*Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* ve *Aeromonas*) ve Gram pozitif (*Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium* ve *Propionibacterium*) mikroorganizmalardır [67, 68].

Süt bileşimini ve dolayısıyla mikrobiyal yükün yapısını ve bolluğunu birçok faktör etkiler. Çiğ süt üretim koşulları, özellikle çiftçilerin hijyenik uygulamaları (örneğin, sağım ekipmanlarının yıkanması ve sağım öncesi ve sonrası meme hazırlığı), peynir yapımında kullanılan ve bozulmaya sebep olan mikroorganizmaları belirler. Sağım ekipmanının yoğun bir şekilde yıkanması ve meme hazırlığı (bireysel yıkamalar), patojen ve bozulmaya neden olan mikroorganizmaların çoğunu (koliformlar ve *Pseudomonas spp.* gibi) içeren çiğ sütle sonuçlanır. Buna karşılık, meme çevresindeki minimum hijyen, tuza dayanıklı flora (*Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Brevibacterium* ve *Staphylococcus spp.* gibi) ve ayrıca LAB dahil olmak üzere mikroorganizmaları korur ve peynir yapıcı faydalı mikroorganizmaların baskın olduğu çiğ sütler elde edilir. Hayvanların sağlık durumu, yemlerinin doğası (yem, silaj vb.) ve çiğ sütün saklama koşulları da mikrobiyal flora bileşimini belirleyen önemli faktörlerdendir. Çiğ sütün düşük sıcaklıklarda depolanması ve sağım ekipmanlarının yoğun şekilde yıkanması *Pseudomonas spp.* türünü baskın hale getirir. Buzdolabında soğutulmuş çiğ sütteki (ilk gün) psikrotrofların %50'si *Pseudomonas* cinsine aittir ve *Pseudomonas fluorescens* baskın türdür. Soğutulmuş çiğ sütte bulunan diğer psikrotroflar *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Listeria* ve *Arthrobacter* cinslerine aittir; *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii* veya *Serratia liquefaciens* gibi *Enterobacteriaceae*'ler de bulunur [69-71].

2.6. Anne Sütünde Probiyotik

Anne sütü, yeni doğanın beslenme ve immünolojik ihtiyaçlarını mükemmel bir şekilde karşılamak için uyarlanmış karmaşık, türe özgü biyolojik bir sıvıdır. Anne sütünün farklı bulaşıcı hastalıklara karşı koruma sağladığı gösterilmiştir. Hastalıkların görülme sıklığı anne sütüyle beslenen bebeklerde formül mama ile beslenen bebeklere göre daha düşüktür. Bu anti enfektif etkinin, kolostrumda ve/veya olgun sütte bulunan birkaç biyoaktif bileşiğe bağlı olduğu öne sürülmüştür. Bunlara immünoglobulinler, immün hücreler, antimikrobiyal asitler, poliaminler, oligosakkaritler, lizozim, laktoferrin gibi glikoproteinler ve ayrı ayrı veya sinerjik olarak hareket ederek patojenik mikroorganizmaları inhibe edebilen biyoaktif peptitler dahildir [72].

Son çalışmalar, steril bir sıvı olmaktan çok, anne sütünün bebek bağırsağı için mükemmel ve sürekli bir kommensal bakteri kaynağı oluşturduğunu göstermiştir. Bu bakteriler, emzirilen çocuklarda bulaşıcı hastalıkların görülme sıklığının ve şiddetinin azaltılmasında da önemli bir rol oynayabilir. Bu hipotez, pastörize insan sütünde antimikrobiyal aktivite kaybını bildiren nispeten eski çalışmalar tarafından desteklenmektedir [73].

Anne sütünde bulunan bakteriler arasında *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* ve *Lactobacillus* türlerine ait olanlar en fazla olanlardır. *L. gasseri*, *L. salyarius*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* ve *L. fermentum* gibi bu anne sütü laktobasillerinin bazılarını, potansiyel olarak probiyotik türler olarak kabul edildikleri için artan bir ilgi vardır [74].

Anne sütü bebekler için en uygun beslenmedir. Temel besinlerin (proteinler, yağlar, karbonhidratlar, vitaminler ve mineraller) yanı sıra anne sütü ayrıca geniş bir yelpazede bağışıklık hücreleri ve anti-inflamatuar, anti-enfektif ve probiyotik etkilere sahip antimikrobiyal peptitler (örneğin, bakteriyosin, laktoferrin, lizozim, laktaderin), sitokinler, kemokinler, immünoglobulinler, büyüme faktörleri, oligosakkaritler, glikokonjugatlar ve yağ asitleri gibi biyoaktif bileşenler içerir. Yapılan çalışmalarda emzirme ile, ishalden korunma, nekrotizan enterokolit, solunum yolu enfeksiyonları (akut otitis media dahil), oral kandidiyaz, enterovirüs enfeksiyonu, atopik dermatit, obezite ve alerjik hastalıklardan koruduğu da kanıtlanmıştır. Bu faydalar özellikle erken doğmuş veya hasta bebekler gibi duyarlılığı artmış bebekler için geçerlidir. Artan kanıtlar, anne sütünün hem anneler (meme bezi sağlığı) hem de bebekler (bağırsak kolonizasyonu ve patojenlere karşı koruma, bağışıklık sisteminin olgunlaşması ve

besinlerin sindirimi) için önemli sağlık etkileri olan kendi mikrobiyotasını içerdiğini göstermektedir [75].

Çoğu bebek maması formülü, baz olarak inek sütü kullanılarak üretilir. İnek sütünde, bebekler için en uygun beslenmeyi sağlamak için güçlendirilmesi gerekir. İnek ve keçi sütündeki laktoz miktarı yaklaşık olarak aynıdır, ancak başka bileşim farklılıkları da vardır. Alfa-s1 kazein geviş getiren hayvanlarda bulunur, ancak anne sütünde yoktur. İnek sütü anne sütü ile karşılaştırıldığında, yüksek konsantrasyonlarda alfa-s1 kazein ve konsantrasyonlarda nükleotid ve poliaminlerin yanı sıra bazı esansiyel amino asitleri içerir. Anne sütü, sialillenmiş ve fukosillenmiş oligosakkaritler (insan sütü oligosakkaritler) üçüncü en büyük bileşen olduğu için geviş getiren sütlerden farklıdır. Anne sütü oligosakkaritleri, bifidobakteriler tarafından büyüme için kullanılır ve anne sütündeki varlıkları, anne sütüyle beslenen bebeklerin dışkısında genellikle bu bakterilerin neden daha fazla bulunduğu muhtemel açıklamasıdır. İnek sütünde ise laktoz dışında bir oligosakkarit azlığı vardır. Genel olarak anne sütü ile çiğ inek sütünün besin değerleri karşılaştırılması **Tablo 2.4**'de verilmiştir [76-78].

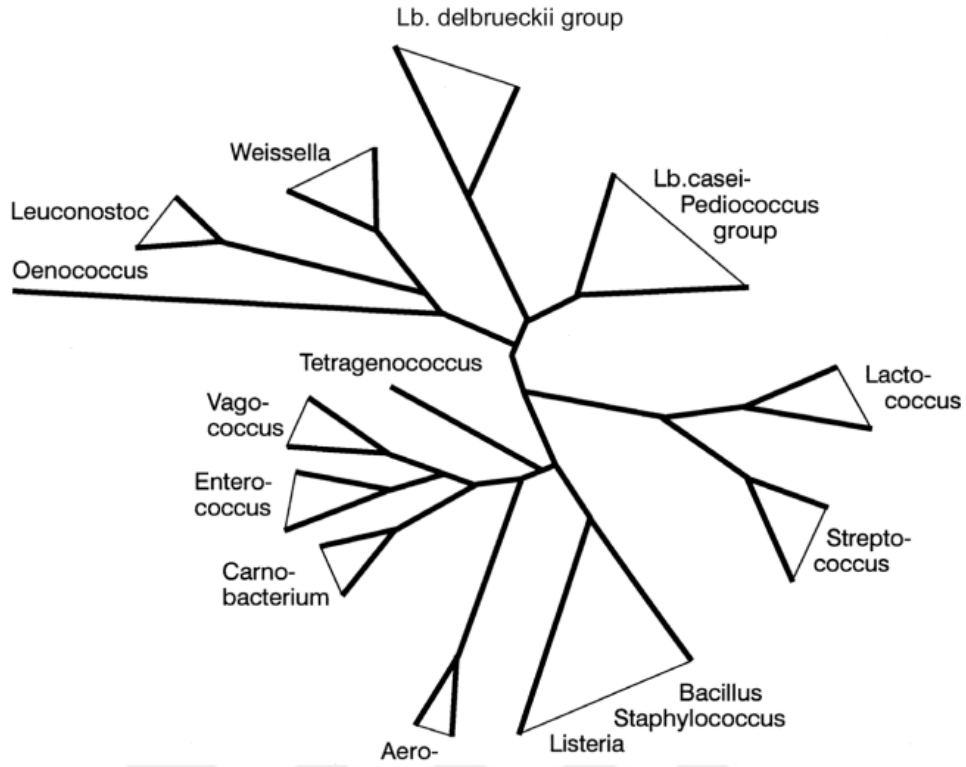
Tablo 2.6. Anne sütünün besin değerinin çiğ inek sütü ile karşılaştırılması [77, 78]

İçerik	Anne sütü	İnek sütü
Toplam katı	10,7-12,9 g/100 mL	2,50-3,80 g/100 mL
Protein	0,9-1,9 g/100 mL	3,27 g/100 mL
Yağ	2,1-4,0 g/100 mL	3,49 g/100 mL
Kazein	0,37 g/100 mL	2,55 g/100 mL
Laktoz	6,3-7,0 g/100 mL	4,52 g/100 mL
Kül	0,2-0,3 g/100 mL	0,2-0,3 g/100 mL
Oligosakkaritler	0,5-0,8 g/100 mL	-
Toplam kolesterol	7,05 mg/100 mL	10,23-14,31 mg/100 mL
Ca	27,6 mg/100 mL	119,8 mg/100 mL
Mg	3,8 mg/100 mL	12,6 mg/100 mL
K	71,3 mg/100 mL	147,9 mg/100 mL
Na	15,9 mg/100 mL	49,3 mg/100 mL
Fe	0,20 mg/100 mL	0,08 mg/100 mL
Zn	0,46 mg/100 mL	0,62 mg/100 mL

2.7. Laktik Asit Bakterileri

LAB terimi, 20. yüzyılın başlarında kademeli olarak kabul edilmiştir. “Süt ekşimesi” ve “laktik asit üreten” bakteriler gibi diğer terimler daha önce aynı bakteriler için kullanılmış ve hafif bir kafa karışıklığına neden olmuştur. Bu durum Orla-Jensen’in 1919 yılında LAB sistematigi üzerinde büyük etkisi olan LAB hakkındaki monografi yayınlanmasıyla sona ermiştir. Orla-Jensen’in LAB cinslerinin sınıflandırılması; morfoloji, belirli sıcaklıklarda üreme, glikoz fermantasyon şekli ve şeker kullanım aralığına dayanmaktaydı. Taksonomi o zamandan beri revize edilmiş olsa da Orla-Jensen tarafından kullanılan karakterler LAB’nin mevcut sınıflandırmasında hala çok önemlidir.

İlk kez 2000 yılında Roos ve ark. *Lactobacillus* cinsi Lact’in yeni türlerini keşfetmiştir [79]. Çalışmada domuz ince bağırsağından kolonizasyon faktör geni (mukus bağlayıcı taşıyan) *L. reuteri* suşlarının izole edilmesi amaçlanmıştır. Daha sonra *Lactobacillus* mukoza suşları ayrıca insan ileal ve vajinal yolundan, sığır bağırsağından ve dışkıdan ve keçi ve koyun sütünden izole edilmiştir. *Lactobacillus* mukoza suşları Gram pozitif, hareketsiz, katalaz negatif, spor oluşturmeyen ve heterofermentatif basillerdir. Son yıllarda, bu türün probiyotik potansiyeli birkaç araştırmacı tarafından araştırılmış ve genomunda adezyonla ilişkili, beta-galaktosidazlar ve safra tuzu hidrolazları gibi enzimlere ait genlerin yaygınlığı gösterilmiştir. Benzer şekilde, kolesterol düşürücü, antiinflamatuvar, ekzopolisakkarit üretimi ve antioksidan aktivite çalışılmıştır. Bu bulgular bu *Lactobacillus* türünün geniş biyolojik fonksiyonel özelliklere sahip bir probiyotik olduğunu göstermektedir [79, 80].



Şekil 2.2. Bazı aerobik ve fakültatif anaerobik Gram pozitiflerini içeren LAB şematik, köksüz filogenetik ağacı [12]

LAB, morfolojik, metabolik ve fizyolojik benzerliklere sahip bir bakteri grubunu oluştururlar ve filogenetik olarak da nispeten yakın akrabadırlar. Grup içindeki bakterilerin genel tanımı, karbonhidratların fermantasyonu yoluyla ana son ürünleri olarak laktik asit üreten Gram pozitif, spor oluşturmeyen, solunum yapmayan koklar veya çubuklardır. Ortak anlaşma, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Streptococcus* olmak üzere dört cinsten oluşan bir çekirdek gruptur. Düşük G+C alt bölümünün bazı aerobik ve fakültatif anaerobik Gram pozitifleri içeren LAB'nin şematik, köksüz filogenetik ağacı Şekil 2.2'de verilmiş olup ağaçta evrimsel mesafeler yaklaşıktır [12]. Son taksonomik revizyonlar birkaç yeni cins önermiştir ve grupta; *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* bulunur. Bu cinsler çubuktur, bunların dışında kalan cinsler koktur. LAB'nin farklı cinslerle sınıflandırılması, büyük ölçüde morfoloji, farklı sıcaklıklarda üreme, glikozu fermantasyon şekline ve üretilen laktik asidin konfigürasyonuna, yüksek tuz konsantrasyonlarında üreyebilme kabiliyetine, asit veya alkali toleransına

dayanmaktadır. Yeni tanımlanan cinslerin bazıları için sınıflandırmada yağ asidi bileşimi ve hareketlilik gibi ek özellikler kullanılmaktadır. Daha yakın zamanlarda, bireysel suşların daha tutarlı ve doğru bir şekilde tanımlanmasına izin veren 16S rDNA dizilimi gibi genetik teknikler geliştirilmiştir. 16S rDNA'nın kısa dizilerinin belirlenmesi, günümüzde LAB'nin izolatlarının tür tayini için basit bir yol olarak kullanılmaktadır [81, 82].

LAB cinslerinin klasik fenotipik testlerle farklılaşmasının bir özeti **Tablo 2.5**'de gösterilmektedir. *Vagococcus* ve *Carnobacterium* cinslerini diğer LAB'lerinden ayıran benzersiz yağ asidi bileşimlerine sahip olmasıdır. Genel olarak, karnobakteriler, pH 9,0'da çoğalma yetenekleri ve laktobasiller için seçici olan asetat ortamında üreyememeleri ile laktobasillerden ayırt edilebilir. *Pediococcus*lar, morfolojileri benzer olduğu için aerokoklarla karıştırılabilir. Bununla birlikte, *Pediococcus*lar aerokoklardan daha çok aside tolerans gösterir. Aerokokların mikroaerofilik özelliğinin aksine anaerobik olarak daha iyi ürerler. *Weissella* türleri, *Leuconostoc*'lar veya heterofermentatif laktobasiller ile kolaylıkla karıştırılabilir. *Oenococcus*lar, klasik testlerle *Leuconostoc* grubuna girer, ancak aşırı asit ve etanol toleransları ile kolayca ayırt edilirler. Cinsler arasında fenotipik benzeşmeler vardır ve **Tablo 2.5**'de özetlenen genel kurallarda istisnalarının bulunabileceği belirtilmelidir. Örneğin, *Enterococcus* cinsi, klasik testlere uymayan birçok tür içerir. LAB'nin sınıflandırılması, cins düzeyinde en doğru olanı doğrudan rRNA dizilimi olan daha karmaşık yöntemlere bağımlı hale gelmektedir. Bilinen rRNA dizileri, cinse özgü problemler geliştirmek için de kullanılmıştır [12].

Tablo 2.7. LAB'ın ayırt edici özellikleri [12]

Morfolojik ve fizyolojik özellikler	Basiller		Koklar							
	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i> V <i>agococcus</i>	<i>Leuconostoc</i> <i>enococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Weissella</i> ^a
Tetrat oluşumu	–	–	+	–	–	–	+	–	+	–
Glikozdan CO ₂ ^b	– ^c	±	–	–	–	+	–	–	–	+
10°C'de üreme	+	±	+	+	+	+	±	–	+	+
45°C'de üreme	–	±	–	+	–	–	±	±	–	–
6,5% NaCl'de üreme	ND ^d	±	+	+	–	±	±	–	+	±
18% NaCl'de üreme	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–
pH 4,4'de üreme	ND	±	–	+	±	±	+	–	–	±
pH 9,6'de üreme	–	–	+	+	–	–	–	–	+	–
Laktik asit ^e	L	D, L, DL ^f	L	L	L	D	L, DL ^f	L	L	L, DL ^f

+ pozitif; - olumsuz; ± sonuç türler arasında değişir; ND belirlenmedi.

^a*Weissella* suşları ayrıca çubuk şeklinde olabilir.

^bGlikozun homo- veya heterofermentasyonu için test; negatif ve pozitif sırasıyla homofermentatif ve heterofermentatif anlamına gelir.

^cOrtama bağlı olarak küçük miktarlarda CO₂ üretilir.

^d%8 NaCl'de büyüme bildirilmemiştir.

^fD-, L- veya DL-laktik asit üretimi türler arasında değişiklik gösterir.

Üretilen laktik asidin konfigürasyonu glikozdan oluşur.

LAB taksonomisi, Gram özelliğine ve çeşitli fermente edilebilir karbohidratlardan laktik asit üretimine dayanır. rRNA dizilimi ile gerçek filogenetik ilişkinin ölçümleri, LAB'nin sınıflandırılmasına yardımcı olup grubun filogenisini netleştirmiştir. Gruptaki çoğu cins filogenetik olarak farklı grup oluşturur, ancak bazıları, özellikle *Lactobacillus* ve *Leuconostoc* çok heterojendir ve filogenetik küme, fenotipik karakterlere dayalı mevcut sınıflandırma ile ilişkili değildir. Kullanılan rutin için en umut verici olanlar, nükleik asit problama teknikleri, polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak kısmi rRNA gen dizilimi ve çözünür protein kalıplarıdır. Büyüme pH 5,5-5,8'de optimumdur ve organizmalar amino asitler, peptitler, nükleotid bazlar, vitaminler, mineraller, yağ asitleri ve karbonhidratlar için karmaşık beslenme gereksinimlerine sahiptir [83]. LAB Gram pozitif, genellikle hareketsiz, spor oluşturmeyen çubuklar ve koklardır. Sitokromları ve porfirinleri (solunum zincirlerinin bileşenleri) sentezleme yeteneklerinden yoksundurlar ve bu nedenle bir proton gradyanı oluşturarak ATP üretemezler. LAB, ATP'yi yalnızca fermantasyon yoluyla, genellikle şekerlerden elde edebilir [84]. Ayrıca enerji üretiminde oksijen kullanmadıkları için anaerobik koşullar altında kolayca ürerler. Ancak oksijen varlığında da gelişebilirler. Peroksidazları olduğu için oksijen yan ürünlerinden (H_2O_2) korunurlar. Bu organizmalar aerotolerant anaeroblardır. LAB arasında iki ana şeker fermantasyon yolu ayırt edilebilir. Glikoliz (Embden-Meyerhof yolu), standart koşullar altında neredeyse yalnızca son ürün olarak laktik asit ile sonuçlanır ve metabolizma, homolaktik fermantasyon olarak adlandırılır [85].

LAB, ana probiyotiklerden biri ve koruyucu kültür olarak incelenmekte olup güvenli kabul edilen yaygın probiyotik organizmalardır. Birkaç probiyotik örneği *Lactobacillus*, *Lactococci*, *Bifidiobacteria* ve *Saccharomyces*'tir. Probiyotik bakteriler, yararlı mikroorganizmaların büyümesini artırarak ve patojen popülasyon mekanizmalarını azaltarak gastrointestinal hastalıkları azaltır. Probiyotikler, hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriler için inhibe edici olan bazı kimyasal bileşikler salmaktadır. Salınan kimyasal bileşiklerin bazıları şunlardır; bakteriyosinler, sideroforlar, lizozimler, proteazlar, hidrojen peroksit vb. Belirtilen bu moleküller diğer bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite gösteren bileşenlerdir. Probiyotikler, sütteki proteinlerinden magnezyum ve kalsiyum emilimini kolaylaştırır, laktozu sindirir ve B vitamini üreterek insan vücudundaki besinlerin biyoyararlanımını önemli ölçüde artırırlar [86-88].

Biyokoruma, doğal mikroflora ve (veya) antibakteriyel ürünler kullanılarak gıdalar için uzun depolama ömrü ve artırılmış güvenlik anlamına gelir. LAB, tüketilmeleri güvenli oldukları ve depolama sırasında birçok gıdanın mikroflorasına doğal olarak baskın oldukları için biyolojik korumada kullanım için büyük bir potansiyele sahiptir. Süt, salamura sebzeler, birçok tahıl ürünü ve karbonhidrat ilaveli etlerde LAB'nin çoğalması yeni bir gıda ürünü oluşturur. Vakum altında veya yüksek karbondioksit konsantrasyonuna sahip bir ortamda soğuk depolanan çiğ et ve balıklarda, LAB baskın popülasyon haline gelir ve eti 'gizli' bir fermentasyonla korunur. Aynı durum, LAB'nin ısıl işleminden geçmesi veya ısıl işleminden sonra ürüne aşılması şartıyla işlenmiş etler için de geçerlidir [89].



3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler

Söz konusu çalışmada kullanılan kimyasallardan; hidrojen peroksit, glikoz, dekstroz, sodyum klorür, kalsiyum karbonat, ketokonazol, kloramfenikol ve amfisilin Sigma-Aldrich'ten (Amerika Birleşik Devletleri) satın alınmıştır. Kullanılan diğer maddelerden olan; dimetil sülfoksit, (Zag Kimya İth. İhr, Türkiye), Gram boyama seti (kristal viyole, Gram iyodin, etanol, safranin) (Norateks Gram Boyama Seti, Türkiye), agar (Himedia, Hindistan), yeast ekstrakt (maya özütü), (Himedia, Hindistan), tris-asetat, (Thermo, ABD), amoksisilin, (Across, Almanya), standart antibiyotik diskler, MRS and M17 besiyerleri (Oxoid, İngiltere) farklı üretici firmalardan elde edilmiştir.

3.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan tüm cihazlar ve marka/modelleri ve kullanım amaçları **Tablo 3.1**'de verildiği gibidir.

Tablo 3.1. Kullanılan cihazlar, modelleri ve kullanım amaçları

Cihaz	Marka/Model	Kullanım amacı
Binoküler ışık mikroskobu	3144002045, CARL ZEISS (Almanya)	Görüntüleme
Otoklav	HV 50L-Hirayama (Hindistan)	Sterilizasyon işlemi
Steril kabin	Heraeus Hera Safe (Almanya)	Biyogüvenlikli işlem
Mikrobiyolojik etüv	FD53, WTC Binder (Hollanda)	Mikrobiyolojik işlem
Su banyosu	11370, TERMAL (Türkiye)	Isıtma işlemi
Sonikatör	4235, Bandelin Sonorex (Almanya)	Sonikasyon işlemi
Buzdolabı	27050EB, Arçelik (Türkiye)	2-4 °C'de numune saklama
Saf su cihazı	01-0489, Nüve (Türkiye)	Deiyonize su üretme
pH metre	PH211, Hanna (İngiltere)	Ortam pH'nı ölçme
Hassas terazi	CP2250, Sartorius (Türkiye)	Analitik ölçekteki tartımların yapılması
Vorteks	TTS 2- Yellowline Jeiotech (Kore)	Mekanik karıştırma
Mc Farland densitometre	DEN 1BBiosan (Letonya)	Bulanıklık ölçümü
Vakumlu evaporatör	Labconco Centrivap (Amerika)	Vakum ortamında buharlaştırma
Dondurucu (-86 °C)	Panasonic (Japonya)	-80 °C'de numune saklama

3.3. Örneklerin Toplanması

Numuneler Eylül ayında süt ineklerinin hayvancılık işletmesinde herhangi bir internal beslenmeye maruz kalmayıp sadece eksternal beslenme ile beslendikleri işletmelerden toplanmıştır. Bunun için, Eskişehir ili Seyitgazi ilçesi civarındaki mera hayvancılığı yapılan mahallelerden alınmıştır. Süt numuneleri Simental ve Brown Swiss (Montofon) inek türlerinden toplanmıştır.

3.4. Besiyerleri

LAB kültür ortamı; dekstrozu 4 g/L, yeast ekstrakt 4 g/L, malt ekstrakt 10 g/L, kalsiyum karbonat 2 g/L, agar 20 g/L olacak şekilde 1 L distile su içerisinde hazırlanmış ve ortam pH'sı 7,3 olarak ayarlanmıştır.

Mueller-Hinton Broth (MHB) besiyeri için 21 g MHB (Merck) tartılıp (CP2250 Sartorius, Türkiye) saf su ile 1 L'ye tamamlanarak otoklavda (HV 50L-Hirayama, Hindistan) 121 °C'de, 1 atm basınç altında 15 dakika steril edilmiştir. Katı besiyeri için ise besiyeri içeriğinin %2'si kadar agar eklenmiştir.

Saboroud Dekstrozu Broth (SDB) besiyeri; 65 g MHB (HiMedia) tartılıp saf su ile 1 L'ye tamamlanarak otoklavda (HV 50L-Hirayama, Hindistan) 121 °C'de, 1 atm basınç altında 15 dakika steril edilmiştir. Katı besiyeri için ise besiyeri içeriğinin %2'si kadar agar eklenmiştir.

Trypton Soy Broth (TSB) besiyeri; 30 g Triptik Soya Broth (Oxoid) tartılıp (CP2250 Sartorius, Türkiye) saf su ile 1 L'ye tamamlanarak otoklavda (HV 50L-Hirayama, Hindistan) 121 °C'de, 1 atm basınç altında 15 dakika steril edilmiştir. Katı besiyeri için besiyeri içeriğinin %2'si kadar agar eklenmiştir.

MRS besiyeri;

M17

Ayrıca deney prosedürünün her bir aşamasında steril olarak kullanılması gereken tüm cam, plastik sarf malzemeler ve besiyeri içerikleri distile suda çözülerek, pH ayarlamaları (PH211 Hanna marka pH metre, İngiltere) yapıldıktan sonra, otoklavda (HV 50L-Hirayama, Hindistan) 1 atmosfer basınç altında 121°C'de, 15 dakika süre ile steril edilmiştir.

3.5. Standart Bakteri Suşları

Çiğ süt numunelerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için *Bacillus subtilis* (NRRL B478) ve *Escherichia coli* (ATCC 35218) test mikroorganizma kültürleri kullanılmıştır.



4. YÖNTEMLER

4.1. Çiğ Süt Numunelerinin Temini

Çiğ süt numuneleri hayvanların günlük süt sağımındaki ilk süt ve son süt örneği olarak iki şekilde alınmıştır. Numuneler elle sağım yöntemi ile toplam 4 numune olarak toplanmıştır. Numuneler steril cam kavanozlara alınıp hemen Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı'na getirilerek -20°C'de buzdolabında (27050EB Arçelik, Türkiye) muhafaza edilmiştir.

4.2. Çiğ Süt Numunelerinin Dilüsyonu ve LAB İzolasyonu

Çiğ süt numunelerinin kültüre edilmesi için MRS ve M17 Agar besiyerleri kullanılmıştır. 1 mL inek sütü numunesi 9 mL %0,9'luk FTS içerisinde 10^{-6} 'ya kadar seyreltilerek, MRS ve M17 agar plakalarına yayma plak yöntemleriyle inoküle edilmiş ve 37 °C'de 24-48 saat etüvde (FD53, WTC Binder, Hollanda) inkübe edilmiştir. İzole edilen koloniler tek koloni ekim yöntemi ile aynı besiyerine pasajlanarak saflaştırılmıştır. İnkübasyondan sonra farklı morfolojilerdeki koloniler seçilerek M17 ve MRS agar besiyerlerine çizgi yöntemiyle ekilerek 24-48 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Gram boyama ile saflıkları kontrol edildikten sonra %20'lik gliserol çözeltisinde -80°C'de dondurucuda (27050EB Arçelik, Türkiye) stoklanmıştır. İzolasyon işlemi sonunda 30 adet saf mikroorganizma kültürü elde edilmiştir. Saflaştırılmış bakteri suşları, daha sonra kullanılmak üzere 4°C'de buzdolabında (27050EB Arçelik, Türkiye) saklanmıştır.

4.3. İzole Edilen Bakterilerin Tanımlanması

4.3.1. Morfolojik tanımlama

Bakteri izolatları temiz lam üzerine çekilmiş, Gram boyama metodu uygulanarak saflık ve morfolojik tayinleri yapılmıştır. İzolatlar lama yayılıp kurutularak preparat hazırlanmış ve ateşte fikse edilmiştir. Kristal viyole ile 1 dakika boyandıktan sonra su ile yıkanmıştır. 1 dakika iyot ile boyanarak su ile yıkanmıştır. Ardından %95'lik etanol ile 10-15 dakika dekolorize edilmiş ve tekrar su ile yıkanmıştır. Son olarak karbol fuksin ile 30 saniye boyandıktan sonra tekrar yıkanmıştır. Son olarak da kuruyan lamlar immersiyon yağı damlatılarak ışık mikroskobu altında görüntüler 100× objektifle büyütülerek kolonilerin morfolojik yapıları incelenmiştir.

4.3.2. Biyokimyasal tanımlama

4.3.2.1. Katalaz testi

Besiyerlerinde 24 saat 37 °C’de inkübe edilerek gelişen kolonilerden örnek alınıp lamda üzerine %3’lük H₂O₂ damlatılarak gaz kabarcığı olup oluşmadığı gözlemlenmiştir. Gaz kabarcığı, katalaz pozitif, kabarcık görülmemesi de katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir [90].

4.3.2.2. Tuz toleranslarının belirlenmesi

İzole edilen bakterilerin tuz toleranslarını gözlemlemek amacıyla %6,5, %13 ve %26 sodyum klorür içeren MRS besiyerleri kullanılmıştır. Yayma ekim tekniği ile saf izolatlar farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış MRS agar besiyerlerine ekilmiştir. Ekim işleminden sonra kültürler 24-48 saat 37 °C’de etüvde (FD53, WTC Binder, Hollanda) inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kültürlerin gelişimi petride oluşan koloniler sayılarak kontrol edilmiştir [91].

4.3.2.3. Sıcaklık toleranslarının belirlenmesi

Kültürler MRS besiyerine ekim yapılarak sıcaklık toleransları değerlendirilmiştir. 48 saat inkübasyon sonrası bakterilerin, 10°C ve 45°C’deki gelişim süreçleri petride oluşan koloniler sayılarak incelenmiştir [92].

4.3.2.4. Glikozdan ve laktozdan gaz-asit üretimi

Bakteri kültürlerinden 1 mL alınıp, Durham tüpü bulunan glikoz fosfat ve laktoz broth içeren tüplere ilave edilmiştir. 37 °C’de 24 saat etüvde (FD53, WTC Binder, Hollanda) inkübasyon sonrası, Durham tüplerindeki gaz kabarcıkları ve besiyerleri rengindeki değişime göre asit oluşumu fermantasyon oluşumuna göre değerlendirilmiştir [3].

4.3.2.5. Antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi

Antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek amacıyla, Penicillin (P10) ve Ampicillin/sulbactam (SAM 20) kağıt diskleri kullanılmıştır [93]. MRS agar besiyerine saf izolatların yoğunluk ayarları hücre densitometresi ile yapılmış ve 0,5 McFarland ayarında ($1,5 \times 10^8$ kob/mL) seyreltilmiş mikroorganizmaların her birinden 100 µL

alınarak 25 mL Mueller Hinton Agar içeren petrilere yayma plak yöntemi ile mikroorganizmaların ekimi gerçekleştirilmiştir. Besiyeri yüzeyine pens aracılığı ile antibiyotik diskler yerleştirilmiştir. 24 saat, 37 °C’de etüvde (FD53, WTC Binder, Hollanda) inkübasyondan sonra, antibiyotik diskleri etrafında oluşan inhibisyon zon çapları; dirençli, orta derecede duyarlı ve duyarsız olarak değerlendirilmiştir .

Sonuçlar CLSI (2015) yönergeleri tarafından önerilen break-point’e göre şu şekilde yorumlanmıştır: 14 mm’den küçük veya eşit inhibisyon bölgesine sahip izolatlar dirençli (R), 20 mm’ den fazla çapa sahip olanlar duyarlı (S) ve zon çapı 15-19 mm arasında olanlar orta duyarlı (I) olarak kabul edilmiştir [94].

4.3.2.6. LAB’nin süpernatantlarının antibakteriyal aktivitelerinin belirlenmesi

MRS broth 25 mL besiyerinde 24 ve 48 saat olarak inkübe edilmiş kültürler 4°C, 4.000×g’de 30 dakika santrifüj (Labconco Centrivap, Amerika) edilmiştir. Santrifüjden sonra hücrelerinden ayrılmış olan süpernatant 0,22 µm gözenek çapına sahip membran filtreden geçirilerek yeni steril falkon tüplere aktarılmıştır.

Süpernatantların antibakteriyel analizi, CLSI M02-A11 standardına göre modifiye edilerek Agar Kuyu Difüzyon Yöntemi ile gerçekleştirilmiştir [95]. Deneyde *Escherichia coli* Gram (-), *Bacillus subtilis* Gram (+) patojen bakteri olarak 24 saat inkübe edilmiş aktifleştirilmiş kültür olarak kullanılmıştır. Yoğunluk ayarları hücre densitometresi ile yapılmış ve 0,5 McFarland ayarında seyreltilmiş mikroorganizmalardan 100’er µL alınarak 25 mL Mueller Hinton Agar içeren petrilere yayma plak yöntemi ile mikroorganizmaların ekimi gerçekleştirilmiştir. Besiyeri yüzeyi kuruduktan sonra 6 mm çapındaki steril agar delici ile petri yüzeylerine açılan bloklara 50 µL kültür süpernatantı eklenmiştir. 24 saat 37 °C inkübasyonun sonunda oluşan inhibisyon zonları (İZ) denklem (1) kullanılarak ölçülmüştür. Karşılaştırma ve kontrol amacıyla antibiyotik olarak kloramfenikol (30 µg/disk) kullanılmıştır [96].

$$IZ = \text{ölçülen değer} - \text{diskçapı} \quad (1)[97]$$

5. BULGULAR VE TARTIŞMA

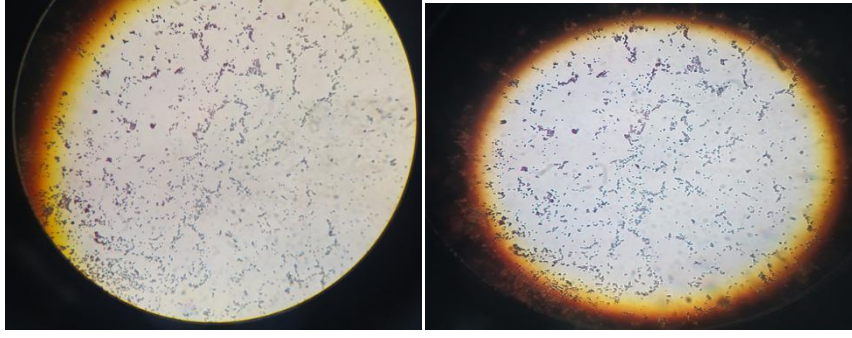
5.1. Çiğ Sütten LAB İzolasyonu ve Morfolojik Tanımlama

Çalışmada analiz edilen çiğ inek sütü numuneleri Türkiye'nin Eskişehir ili Seyitgazi ilçesinde meralık alanda beslenen ve herhangi bir işlenmiş gıda ile beslenmeyen Simental ve Montofon inek türlerinden elle sağım ile toplanmıştır. Çiğ süt numuneleri hayvanların günlük süt sağımındaki ilk süt ve son süt örneği olarak 2 şekilde alınmıştır.

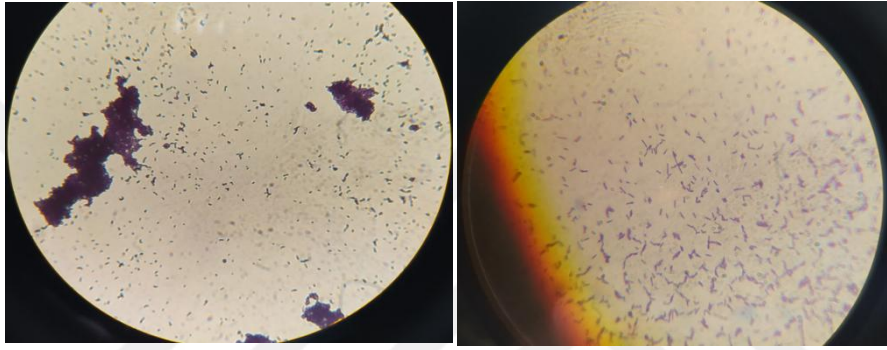
Probiyotik aktiviteye sahip bakteri izolatlarını seçmek için birincil ve ikincil tarama olmak üzere iki aşamalı bir tarama yapılmıştır. Birincil tarama, morfolojik ve fizyolojik değerlendirmeyi (Gram boyama ve katalaz testi) ve ardından abiyotik stres koşullarına (tuzluluk ve sıcaklık toleransı) maruz bırakmayı içermiştir. Gram boyamada lamda hazırlanan çiğ süt preparatlarının ışık mikroskobu altında renkleri gözlenmiştir. Gram boyama çalışmalarında ışık mikroskobu altında pembe renkli bakteriler Gram negatif, mor renkli olanlar ise Gram pozitif olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 30 saf izolatın 27 tanesinin Gram pozitif (+), 3 tanesinin ise Gram negatif (-) olduğu belirlenmiştir. İzolatların morfolojik incelemesinde kok-kokobasil morfoloji ve basil morfoloji gözlemlenmiştir. Her bir izolatın görünümü **Tablo 5.1**'de verildiği gibidir. Elde edilen saf izolatlardan kok görünümüne sahip olanlar **Şekil 5.1**'de; kokobasil görünümüne sahip olanlar **Şekil 5.2**'de ve basil görünümüne sahip olanlar ise **Şekil 5.3**'de verilmiştir. İzolatların morfolojik, kültürel, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri, tanımlamaları ve ileri deneyler için ayrıntılı olarak incelenmiştir.

Tablo 5.1. Her bir izolatın morfolojik özellikleri

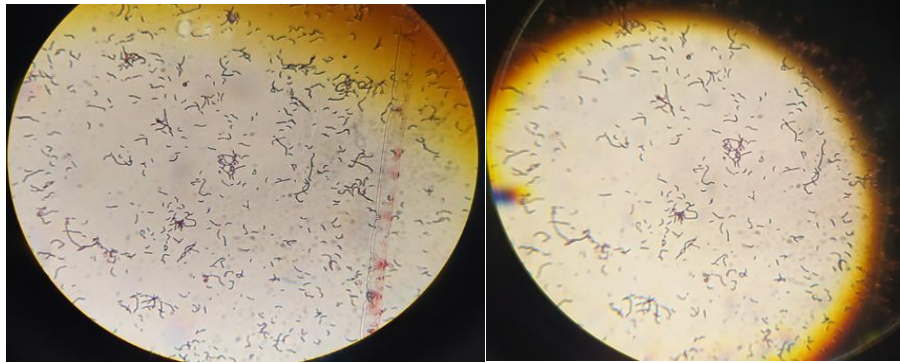
İzolat No	Morfolojik Özellikleri	Katalaz Özellikleri	Gram Özellikleri
Kod 1	Basil	-	+
Kod 2	Kok	-	+
Kod 3	Kok	-	+
Kod 4	Kok	+	+
Kod 5	Kok	-	+
Kod 6	Basil	-	+
Kod 7	Kok	-	-
Kod 8	Kok	-	+
Kod 9	Kok	+	+
Kod 10	Kok	-	+
Kod 11	Basil	-	+
Kod 12	Basil	+	+
Kod 13	Basil	-	+
Kod 14	Kok	+	-
Kod 15	Kokobasil	-	+
Kod 16	Kok	-	+
Kod 17	Kok	+	-
Kod 18	Kok	+	+
Kod 19	Kok	-	+
Kod 20	Kokobasil	-	+
Kod 21 (PS1)	Basil	-	+
Kod 22 (PS2)	Basil	-	+
Kod 23 (PS3)	Basil	-	+
Kod 24 (PS4)	Basil	-	+
Kod 25 (PS5)	Basil	-	+
Kod 26	Kok	-	+
Kod 27	Kok	-	+
Kod 28	Kok	+	+
Kod 29	Kokobasil	-	+
Kod 30	Kok	-	+



Şekil 5.1. Saf izolatlardan kok görüntüsüne sahip olanlar (100× büyüme oranı)



Şekil 5.2. Saf izolatlardan kokobasil görüntüsüne sahip olanlar (100× büyüme oranı)



Şekil 5.3. Saf izolatlardan basil görüntüsüne sahip olanlar (100× büyüme oranı)

5.2. Biyokimyasal Tanımlama

5.2.1. Katalaz testi

Katalaz, birçok mikroorganizma tarafından üretilen, hidrojen peroksidi su ve oksijene parçalayan ve gaz kabarcıklarına neden olan bir enzimdir. Gaz kabarcıklarının oluşması katalaz enziminin varlığını gösterir [98]. Gaz kabarcığı, katalaz pozitif,

kabarcık görülmemesi de katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir. Saf izolatlardan 23 tanesi katalaz negatif, 7 tanesi de katalaz pozitif olarak gözlemlenmiştir. Çalışmanın bir sonraki aşaması için katalaz negatif ve basil formunda olan suşlar seçilerek devam edilmiştir. Çünkü LAB çoğunlukla katalaz negatiftir, ancak bazı istisnalar vardır [99]. Katalaz üreten *Lactococcus lactis*, kolon kanseri fare modelinde katalaz aktivitesini arttırmak ve H₂O₂ seviyesini azaltmak için kullanılmıştır [100]. Çok sayıda laktobasil başlangıçta antioksidatif aktiviteleri açısından in vitro olarak taranmıştır [101]. *Lactobacillus casei* ssp. en yüksek antioksidatif aktiviteyi sergileyen *casei* suşları daha ileri in vivo çalışmalar için seçilmiştir. Linoleik asit peroksidasyonu ve mikrozom-tiyobarbitürik asit testinin sonuçları, *L. casei* ssp. *casei* 19, test edilen 12 suş arasından maksimum antioksidan kapasitesi ile karakterize edilmiştir [102]. Martin ve ark.'nın köpek sütünden elde ettikleri izolatlarda 16S rDNA PCR dizilimi ile tanımlama yaptıklarında Gram-pozitif basilin, *Weissella spp.*, katalaz negatif ve oksidaz negatif reaksiyon gösteren kokoid izolatların *Enterococcus* veya *Streptococcus* cinsine ait olduğunu göstermişlerdir. Katalaz pozitif ve oksidaz negatif koklar ise *Staphylococcus spp.* ait olduğu görülmüştür [103].

5.2.2. Tuz toleranslarının belirlenmesi

Yayma ekim tekniği ile saf izolatlar farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış MRS broth besiyerlerine ekilmiştir. Ekim işleminden sonra kültürler 24-48 saat 37 °C de etüvde (FD53,WTC Binder, Hollanda) inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kültürlerin gelişimi petride oluşan koloniler sayılarak kontrol edilmiştir. İzolatların farklı tuz konsantrasyonlarına olan toleransları **Tablo 5.2'**de verilmiştir.

Tablo 5.2. İzolatların farklı tuz konsantrasyonlarındaki toleransları

İzolat Kodu	Tuz konsantrasyonu		
	%6,5	%13	%26
Kod 1	+++	++	+
Kod 6	+++	++	+
Kod 11	+++	++	+
Kod 13	+++	++	+
PS1	+++	++	+
PS2	+++	++	+
PS3	+++	++	+
PS4	+++	++	+
PS5	+++	++	+

+++İyi gelişmiş, ++Orta Gelişmiş, +Az Gelişmiş

Tüm izolatlar, 37 °C’de 24 saat sonra %26’ya varan tuz konsantrasyonlarına maruz kalma altında %50’den fazla hayatta kalma yüzdesi sunarak tuza karşı iyi bir kapasite sergilemişlerdir. Tüm izolatlar %6,5 NaCl konsantrasyonunda iyi gelişim, ancak %13 NaCl konsantrasyonunda orta gelişim ve %26 NaCl konsantrasyonunda ise gelişim göstermeye devam etmişlerdir. Suşların biyokimyasal tanımı, tuza direnç ve toleransın türlere bağlı olmadığını göstermiştir; ancak gözlemlenen aynı türün suşları arasında farklı oldukları ek araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir [104]. Bu izolatlar, antibiyotiğe duyarlılık, sıcaklık ve glikoz-laktozdan gaz-asit üretimi dahil olmak üzere özellikleri ayrıca araştırılmıştır.

5.2.3. Sıcaklık toleranslarının belirlenmesi

48 saat inkübasyon sonrası bakterilerin, 10 °C ve 45 °C’deki kültürlerin gelişimi petride oluşan koloniler sayılarak incelenmiş ve elde edilen sonuçlar **Tablo 5.3**’de verilmiştir.

Tablo 5.3. İzolatların farklı sıcaklık oranlarındaki toleransları

İzolat	Sıcaklık	
Kod	10 °C'de gelişim	45 °C'de gelişim
Kod 1	-	-
Kod 6	-	-
Kod 11	-	+
Kod 13	-	-
PS1	-	-
PS2	-	-
PS3	-	+
PS4	-	-
PS5	-	-

⁺Gelişmiş, ⁻Gelişmemiş

İzole edilen bakterilerden iki tanesi 45°C'de optimal olarak ürerken 10 °C'de hiç gelişme gözlenmemiştir. Bakterilerin ısı direnci türler arasındaki genetik farklılıklardan, hücrelerin fizyolojik durumundan ve pH, su aktivitesi, tuz içeriği ve koruyucu maddeler gibi çevresel faktörlerden etkilendikleri bilinmektedir [98]. Ayrıca bazı LAB suşlarının düşük (15 °C'nin altı)ve yüksek (55 °C'ye kadar) sıcaklıklarda büyüebildiği bildirilmiştir. İnek sütünden elde edilen LAB suşlarının ise 80 °C'ye kadar dayanabildiği ancak üreme karakterlerinde büyük değişiklikler gözlenmiştir [105]. Bu durum özellikle sütlerin pişirilmesi veya pastörizasyonunda göz önünde bulundurulması gerekir. Özellikle yoğurt gibi ısıl işlem ve mayalanmaya maruz kalan ürünlerde LAB içerik ve davranışları önemlidir. Örneğin yapılan bazı çalışmalara yakından bakılırsa; yoğurttan izole edilmiş *Lactobacillus acidophilus*, mikro aerofilik koşullarda 37 °C'de 72 saat boyunca en iyi büyümeyi göstermiştir. *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* ile karşılaştırıldığında değişken bir büyüme davranışı gösterir ve 45 °C'de hayatta kalamaz. *Lactobacillus delbrueckii* alt türü *bulgaricus* 45°C'de gelişir ancak 15°C'de büyümmez; ve *Lactobacillus reuteri* 45 °C'de hayatta kalamaz, ancak 15 °C'de üreme gösterir [106]. *Lactobacillus acidophilus* 45 °C'de hayatta kalırken, *Lactobacillus casei* farklı bir davranış göstererek 45 °C'de yaşayamaz [107].

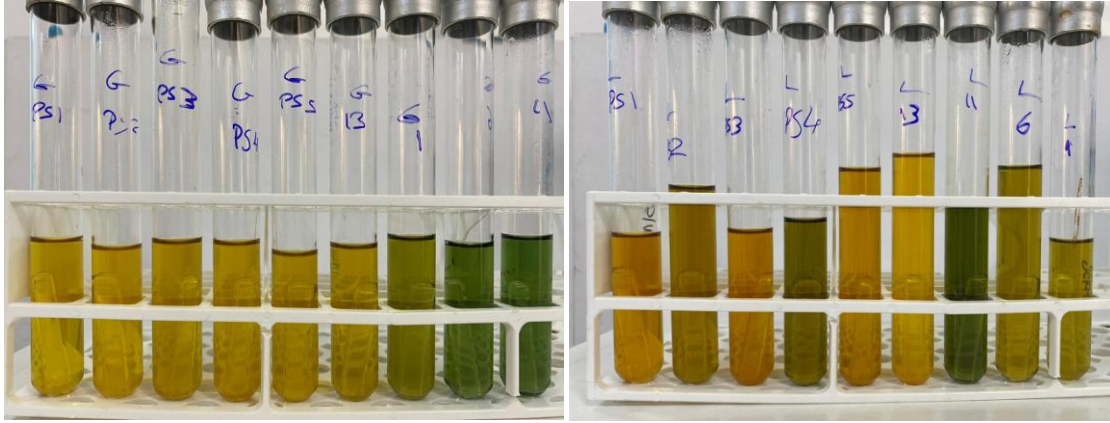
5.2.4. Glikozdan ve laktozdan gaz-asit üretimi

Laktoz, dekstroz, maltoz, galaktoz ve süktroz gibi çeşitli şekerlerin fermantasyonel parçalanması fermantasyon tüpünde gerçekleştirilir. Fermantasyon tüpü, metabolizmanın son ürünü olarak gaz üretiminin saptanması için bir Durham tüpü (yani, kültür tüpünde ters bir konuma yerleştirilmiş küçük bir tüp) içeren bir kültür tüpüdür. Fermentasyon sıvısı, besin sıvısı bileşenlerini, spesifik bir karbohidratı ve nötr bir pH'da gerçekleştirilir. Kırmızı olan ve organik asit üretimi nedeniyle 6,8'lik bir pH'da veya altında sarıya dönen bir pH göstergesini (fenol kırmızısı) içerir. LAB izolatının tamamı fermantasyon test tüplerine inoküle edilmiş ve renk değişimi ve asit üretimi gözlemlenmiştir. 37°C'de 24 saat inkübasyon sonrası, Durham tüplerindeki gaz kabarcıkları ve besiyerleri rengindeki değişime göre asit oluşumu fermantasyon sonrası asit ve gaz oluşumuna göre değerlendirilmiştir. Besiyerlerindeki yeşil rengin sarıya dönmesi ve Durham tüpleri ucunda gaz kabarcığının oluşması pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir. Elde edilen gözlem sonuçları **Tablo 5.4**'de verilmiştir. Ayrıca glikoz ve laktozdan gaz-asit üretiminde farklı besi yerlerindeki görüntüleri de **Şekil 5.4**'de verildiği gibidir.

Tablo 5.4. İzolatların farklı karbohidrat içeren besiyerindeki davranışları

İzolat	Karbohidrat	
Kod	Glikoz	Laktoz
Kod 1	+	+
Kod 6	-	+
Kod 11	-	-
Kod 13	+	+
PS1	+	+
PS2	-	-
PS3	+	+
PS4	-	-
PS5	+	+

⁺ Asit ve Gaz oluşumu var, ⁻ Asit ve Gaz oluşumu yok



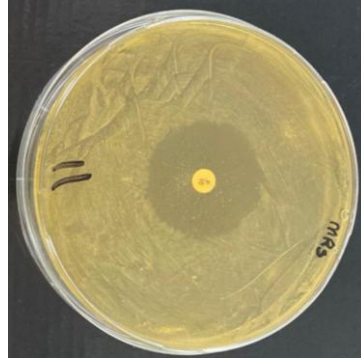
Şekil 5.4. İzolatların farklı karbohidrat içeren besiyerlerindeki görünimleri

Bu izolatlardan 45°C’de üremiş iki izolattan biri olan KOD 11 her iki karbohidrat besiyerinde CO₂ üretmezken, PS 3 izolatında her iki besiyerinde gaz çıkışı gözlenmiş olup glikoz ve laktozdan CO₂ üretmiştir. Bu özellikler, fakültatif heterofermentatif laktobasiller olarak sınıflandırılmalarını önerir [108]. LAB, gıda fermantasyonlarında ve fermente gıda ürünlerinde tat ve dokuyu arttırmada kullanılan en önemli bakteriler arasındadır. Glikozdan ana ürün olarak laktik asit üretimi ve gıda bozulmasına neden olan bakteri ve patojenlerin çoğalmasını önleyen bakteriyosinler, hidrojen peroksit, diasil vb. gibi büyümeyi önleyici maddeler ile karakterize edilirler. Bifidobakteriler gibi bazı basiller de ana son ürün olarak laktik asit oluşturur. LAB, basillerle ilgili Gram pozitif bakterilerin *Clostridium* dalında gruplanırken, *Bifidobacterium Actinomycetes*’e aittir. LAB’nin DNA’sı düşük G+C içeriğine sahiptir.

5.2.5. Antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi

Liu ve ark. önerdiği yöntemle göre yapılan ekimlerden sonra diskler yerleştirilmiştir [93]. Besiyeri yüzeyine steril pens aracılığı ile antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. 24 saat, 37°C’ de inkübasyondan sonra, antibiyotik diskleri etrafında oluşan inhibisyon zon çapları; dirençli, orta derecede duyarlı ve duyarsız olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar CLSI (2015) yönergeleri tarafından önerilen break-point’e göre şu şekilde yorumlanmıştır: 14 mm’den küçük veya eşit inhibisyon bölgesine sahip izolatlar dirençli (R), 20 mm’ den fazla çapa sahip olanlar duyarlı (S) ve zon çapı 15-19 mm arasında olanlar orta duyarlı (I) olarak kabul edilmiştir [109]. Çalışmada gözlemlenen antibiyotik diskinin inhibisyon zon görüntülerinden bir tanesi **Şekil 5.5**’de

sunulmuştur. İzolatların farklı antibiyotiklere karşı dirençleri ise **Tablo 5.5**'de verilmiştir.



Şekil 5.5. Antibiyotik diskinin inhibisyon zon görüntüleri

Tablo 5.5. İzolatların farklı antibiyotiklere karşı dirençleri

İzolatlar	Standart Antibiyotikler	
	Penicilin (P 10)	Ampicillin/sulbactam (SAM 20)
Kod 1	S	R
Kod 6	S	R
Kod 11	S	R
Kod 13	S	R
PS1	S	R
PS2	S	R
PS3	S	S
PS4	S	R
PS5	S	R

LAB izolasyonu ve tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan bir dizi insan ve veteriner antibiyotiklerine duyarlılık, tüm potansiyel probiyotik suşlar için değerlendirilmelidir. Bu prosedür, konakçı için zararlı olabilecek, aktarılabılır antibiyotik direnç genlerine sahip potansiyel probiyotik suşların saptanmasında esastır. Söz konusu çalışmada; incelenen LAB suşları, bazı antibiyotiklere karşı değişen derecelerde direnç göstermiştir. Elde edilen sonuçlara göre çiğ inek sütünden elde edilen suşlar ampisiline dirençliken penisiline duyarlı oldukları bulunmuştur.

Literatürde, laktobasil suşları genellikle β -laktam antibiyotiklere (seftriakson, ampisilin, oksasilin dahil) β -laktamaz varlığı nedeniyle dirençli olduğu iddia edilmektedir [110].

LAB'nin kaynağı ve coğrafi konumu da potansiyel probiyotik suşların antibiyotik duyarlılık modellerini belirleyen faktörlerdir [111]. Çoğu LAB suşu tarafından antibiyotik direncinin suşa özgü moleküler temeli, daha fazla derinlemesine çalışma gerektirir. Probiyotik suşların içsel direnci, bağırsak mikrobiyotasının iyileşmesi kolaylaştırıldığı için antibiyotiklerle birlikte uygulandığında hem terapötik hem de önleyici faydalar sağlar [112]. İnek sütünden elde edilen LAB suşları için kaydedilen çoklu antibiyotiğe direnç (MAR) indeksleri, bu suşların yanlış antibiyotik kullanımının olduğu bir ortamdan elde edildiğini göstermektedir. Dahası; MAR indeksinin $>0,2$ 'nin antimikrobiyal ajanlara serbest erişimi ve kötüye kullanımı olan bir ortamdan gelen suşları gösterdiğini bildiren çalışmalar mevcuttur [113]. Bu durum, hayvan yetiştiricilerinin hayvanlarında kısıtlama olmaksızın antibiyotik kullandıkları çalışma alanı içinde geçerlidir [110].

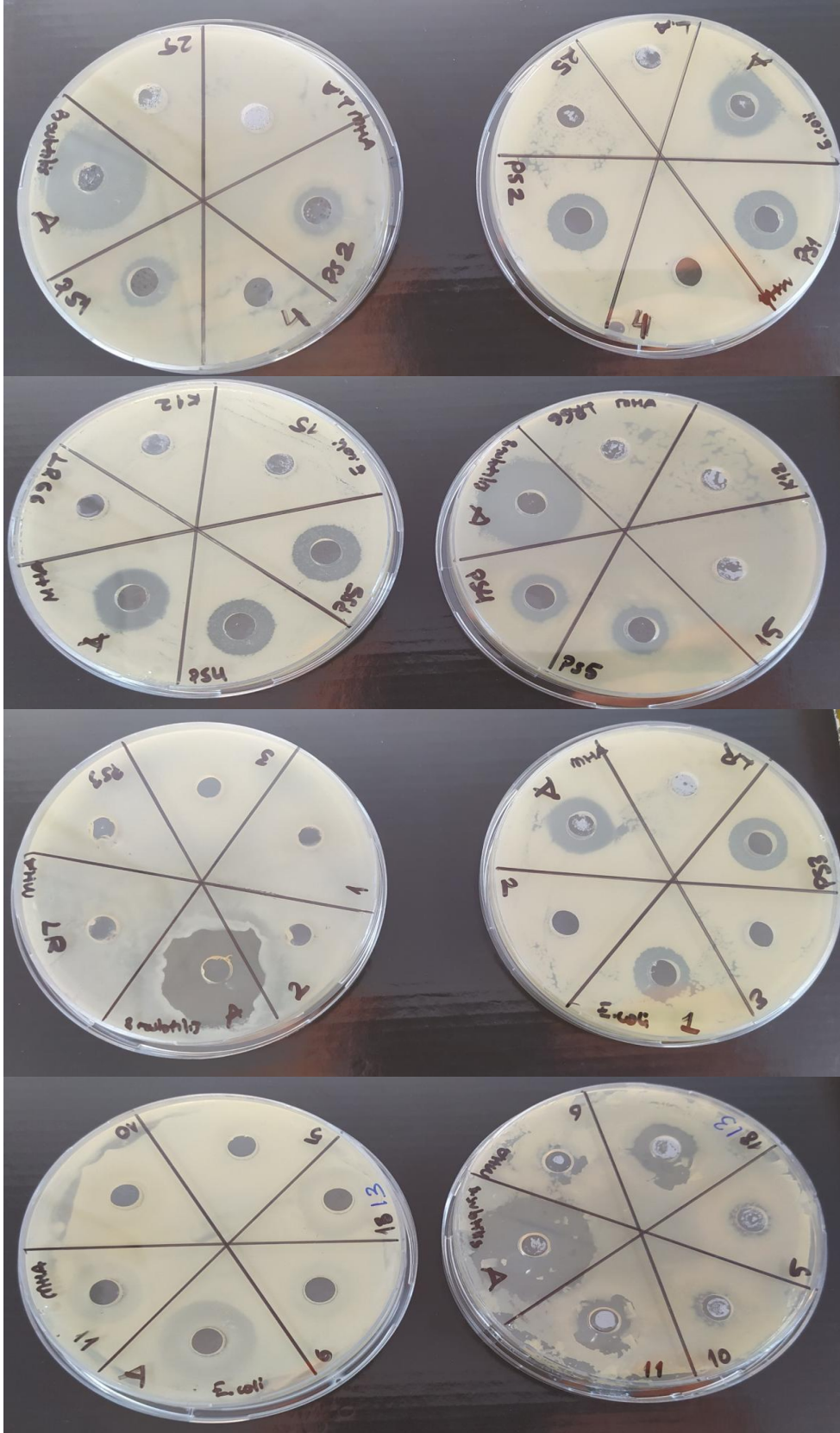
5.2.6. LAB'nin süpernatantlarının antibakteriyal aktivitelerinin belirlenmesi

24 saat 37°C inkübasyonun sonunda oluşan inhibisyon zonları (İZ) denklem (1) kullanılarak ölçülmüştür. Karşılaştırma ve kontrol amacıyla antibiyotik olarak kloramfenikol kullanılmıştır [96]. **Tablo 5.6**, patojenlerin LAB suşları tarafından inhibe edilmesinden kaynaklanan zon çapları gösterilmektedir. LAB suşlarının test mikroorganizmalarına karşı inhibisyon bölgeleri gösterilmiştir. Karşılaştırma antibiyotiği olan kloramfenikolden daha büyük inhibisyon zon çapı *Escherichia coli* için Kod 13 izolatında elde edilmiştir. Ayrıca bu tür için Kod 11 ve PS5 izolatları da kloramfenikolden daha düşük olsa da çok yakın inhibisyon çapı göstermişlerdir. *Bacillus subtilis* için ise Kod 13 ve 11 karşılaştırma antibiyotiğine göre %40 daha az inhibisyon gösterirken, PS5 için bu oran %30 olarak bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada LAB tarafından salgılanan maddelerin (antimikrobiyal aktivitelerinden sorumlu olan) ısıya duyarlı olmadığı ancak nötralize edildiğinde ise antimikrobiyal aktivitede azalma veya tam kayıp saptanmıştır [110]. Bu sonuçlar, asit üretiminin bu LAB izolatlarının inhibitör etkisine ve bakteriyosinlerin etkilerine büyük ölçüde katkıda bulunduğunu göstermiştir [114].

Tablo 5.6. Laktik asit bakteri izolatlarının agar kuyu difüzyon yöntemi ile belirlenen inhibisyon zon çapları (mm)

İzolatlar	İnhibisyon Zon Çapı (mm)	
Kod	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Kod 1	6	-
Kod 6	6	-
Kod 11	10	8
Kod 13	14	8
PS1	8	4
PS2	6	4
PS3	8	-
PS4	8	6
PS5	10	6
Kloramfenikol	12	20

Agar difüzyon yöntemi ile ekilen bakteri izolatlarının üzerine yerleştirilen laktik asit bakterilerine ait süpernatant içeren kuyucukların inkübasyondan sonra oluşturdukları inhibisyon zonları **Şekil 5.6**'da verildiği gibidir. Literatürde bugüne kadar söz konusu çalışmaya benzer probiyotik yetenekleri olan LAB'nin anne sütünden izolasyonunu ve fermente süt ürünü başlatıcısı olarak uygulamalarını inceleyen bir çalışma mevcuttur. Çalışmada; *Lactobacillus plantarum* 5H1 ve *Lactobacillus plantarum* 5L1, önemli antimikrobiyal aktivite, antimikrobiyallere duyarlılık, geniş bir enzimatik aktivite spektrumu, Caco-2 hücrelerine yapışma ve *Salmonella enterica* yapışmasında azalma sergilemiştir [115]. Ayrıca, bu seçilmiş suşlar, fermantasyon ve 4 °C'de fermente sütün depolanması sırasında ilginç bir canlılık sergilemiştir [115]. Öyle görünüyor ki; daha ileri araştırmalar, anne sütünden izole edilmiş potansiyel probiyotiklere sahip ticari yoğurt başlangıçları kullanılarak fermente süt üretimine odaklanacak ve mikrobiyolojik, doku ve duyu analizi yoluyla nihai ürünün kalitesini değerlendirecektir.



Şekil 5.6. Antibiyotik disklerinin inhibisyon zon görüntüleri

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma meralarda beslenen ineklerin sütünden izole edilen bakterilerin kısmi karakterizasyonu ve probiyotik özelliklerinin belirlenmesini kapsamaktadır. Probiyotik özelliklerin belirlenmesi probiyotik izolat karakterizasyonu için genel olarak yapılan bazı testlere göre morfolojik, biyokimyasal özelliklerin belirlenmesi ve antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesi ile araştırılmıştır.

Yapılan çalışmalar ve elde edilen sonuçlar şöyle sıralanabilir;

1. Farklı süt örneklerinden toplam 30 adet saf mikroorganizma izolatı elde edilmiştir.
2. Yapılan testler sonucunda izolatlardan 9 tanesinin probiyotik olabilme potansiyeli taşıdığı görülmüştür.
3. Biyokimyasal özellik açısından katalaz enzimi mevcudiyeti, tuz ve sıcaklık toleransı, glikoz ve laktoz fermentasyonu açısından değerlendirmeler yapılmıştır. Buna göre düşük tuz konsantrasyonunda iyi gelişim, yüksek sıcaklığa daha fazla tolerans ve 5 suşta glikoz fermentasyonu, 6 suşta ise laktoz fermentasyonu gözlenmiştir. Ayrıca aralarında sadece tek bir suşta (PS3) düşük tuz konsantrasyonunda iyi gelişim, yüksek sıcaklığa daha fazla tolerans, hem glikoz hem de laktoz fermentasyonu görülmüştür.
4. İzolatların standart antibiyotiklere karşı hassasiyeti araştırılmış ve karşılaştırma antibiyotiği olan kloramfenikolden daha büyük inhibisyon zon çapı (%16 daha fazla) *Escherichia coli* için Kod 13 izolatında elde edilmiştir. Ayrıca bu tür için Kod 11 ve PS5 izolatlarında kloramfenikolden daha düşük (%17 daha az) olsa da çok yakın inhibisyon göstermişlerdir.
5. Probiyotik bakteriler için sağlığa yansıyan en belirgin özelliklerinden olan patojenlere karşı antimikrobiyal etkinliğin araştırılması amacıyla izolat kültür süpernatatlarının *in vitro* antimikrobiyal etkinliği araştırılmıştır. Sadece 6 tanesinin antibakteriyel özellikte olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada süt kaynaklı izolatların probiyotik içeren ürünler için kültür olarak kullanılması ya da probiyotik ham madde olarak değerlendirilmesine yönelik başlangıç olarak değerlendirilen adım atılmıştır. Probiyotik suş eldesi için ana kriterlere uygun izolatlar seçilmiştir. Bu izolatların güvenilir probiyotik kaynağı olarak kullanmak ve tam identifikasyonları için daha ileri düzeyde çalışmalar gereklidir. Bu kapsamda; aşağıdaki özellikleri test etmek gerekir.

1. İzolatların moleküler identifikasyonu yapılmalıdır.

2. İnsan sağlığına y6nelik ileri *in vitro* (h6cre k6lt6rlerinde sitotoksisite 6zelliği) ve *in vivo* (bağırsak y6zeyine yapışma, safra tuz toleransı, mide ortamına direnç ve kolestrol asimilasyonu) alışmalar y6r6t6lmedir.
3. Isı/sonikasyon gibi bir uygulama ile postbiyotikler elde edilip analite uygun bir analitik teknik seçilerek karakterizasyonu (HPLC, GC-MS, LC-MS/MS) yapılmalıdır.
4. H6cre y6zeyi hidrofobikliği, β -Galaktosidaz aktivitesi, ekzopolisakkarit 6retimi ve hemolitik aktivite gibi ilave probiyotik karakterizasyon çalışmaları yapılmalıdır.
5. Teknolojik 6zellikleri (suş stabilitesi, 6r6nlerde canlılık, bakteriyofaj direnci) belirlenmelidir.
6. Sağlığın korunması ve iyileştirilmesinde bağırsak mikrobiyotasına probiyotik mikroorganizmaların faydaları daha iyi tanınmakta ve artan bilimsel çalışmalar ilgi çekmektedir. Seçilen probiyotik izolatlar konakçı için faydalı olan fizyolojik ve genetik 6zelliklere ve teknolojik 6zelliklere sahip olup olmadığı açısından değerlendirilmelidir.
7. Probiyotik organizmalar mide asidi ve safra varlığında yaşayabilmeli, ayrıca gastrointestinal epitel tabakasına yapışabilmeli ve kolonize olabilmelidir. Dolayısıyla mide asiditesine dayanıklılıkları açısından değerlendirilmeleri gerekir. Ayrıca, konakçı için g6venli ve patojenik olmamalıdır.

Çalışmada t6m verilenlere bakıldığında; bu sonuçlar, konakçı sağlığını geliştirmek için probiyotik 6zelliklere sahip LAB fermente s6tlerin geliştirilmesi için faydalı olabilir. Sağlığın korunması ve iyileştirilmesinde 6zellikle bağırsak mikrobiyotasına probiyotik katkının faydalarına bilimsel ilgi gitgide artmaktadır. Yeni probiyotik suşlar, konakçı için faydalı olan fizyolojik, genetik 6zelliklere ve teknolojik 6zelliklere sahip olup olmadığı açısından değerlendirilmeli ve detaylı ileri d6zey çalışmaların yapılması için yeni projeler oluşturulmalıdır.

KAYNAKÇA

- [1] Preidis, G.A., Versalovic, J. (2009). Targeting the human microbiome with antibiotics, probiotics, and prebiotics: gastroenterology enters the metagenomics era. *Gastroenterology*, 136 (6), 2015-2031.
- [2] Hati, S., Mandal, S., Prajapati, J. (2013). Novel starters for value added fermented dairy products. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 1 (1), 83-91.
- [3] Kondrotiene, K., Lauciene, L., Andruleviciute, V., Kasetiene, N., Serniene, L., Sekmokiene, D., Malakauskas, M. (2020). Safety assessment and preliminary in vitro evaluation of probiotic potential of *Lactococcus lactis* strains naturally present in raw and fermented milk. *Current Microbiology*, 77 (10), 3013-3023.
- [4] Schrezenmeir, J., De Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition *American Journal of Clinical Nutrition* 73. Pp. 361S-364S,
- [5] Senok, A., Ismaeel, A., Botta, G. (2005). Probiotics: facts and myths. *Clinical Microbiology and Infection*, 11 (12), 958-966.
- [6] FAO/WHO (2001): Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. FAO Rome, pp. 1-34.
- [7] Metchnikoff, E. (1907). Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. *The prolongation of life: Optimistic studies*. W. Heinemann, London, 161-183.
- [8] Lilly, D.M., Stillwell, R.H. (1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147 (3659), 747-748.
- [9] Zendeboodi, F., Khorshidian, N., Mortazavian, A.M., da Cruz, A.G. (2020). Probiotic: conceptualization from a new approach. *Current Opinion in Food Science*, 32, 103-123.
- [10] Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J.-M., Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT-Food Science and Technology*, 50 (1), 1-16.
- [11] Granato, D., Branco, G.F., Nazzaro, F., Cruz, A.G., Faria, J.A. (2010). Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9 (3), 292-302.

- [12] Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S., von Wright, A. (2011). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. Crc Press.
- [13] Gibson, G.R., Probert, H.M., Van Loo, J., Rastall, R.A., Roberfroid, M.B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition research reviews*, 17 (2), 259-275.
- [14] Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of nutrition*, 137 (3), 830S-837S.
- [15] Schrezenmeir, J., de Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *The American journal of clinical nutrition*, 73 (2), 361s-364s.
- [16] Zhang, L., Li, N., Caicedo, R., Neu, J. (2005). Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 production in caco-2 cells. *The Journal of nutrition*, 135 (7), 1752-1756.
- [17] Lopez, M., Li, N., Kataria, J., Russell, M., Neu, J. (2008). Live and ultraviolet-inactivated *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease flagellin-induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *The Journal of nutrition*, 138 (11), 2264-2268.
- [18] Ostad, S., Salarian, A., Ghahramani, M., Fazeli, M., Samadi, N., Jamalifar, H. (2009). Live and heat-inactivated lactobacilli from feces inhibit *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* adherence to Caco-2 cells. *Folia microbiologica*, 54 (2), 157-160.
- [19] Taverniti, V., Guglielmetti, S. (2011). The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes & nutrition*, 6 (3), 261-274.
- [20] Tsilingiri, K., Rescigno, M. (2013). Postbiotics: what else? *Beneficial microbes*, 4 (1), 101-107.
- [21] Aguilar-Toalá, J.E., Arioli, S., Behare, P., Belzer, C., Berni Canani, R., Chatel, J.-M., D'Auria, E., de Freitas, M.Q., Elinav, E., Esmerino, E.A. (2021). Postbiotics—When simplification fails to clarify. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18 (11), 825-826.
- [22] Vinderola, G., Sanders, M.E., Salminen, S. (2022). The Concept of Postbiotics. *Foods*, 11 (8), 1077-1087.

- [23] Collado, M., Vinderola, G., Salminen, S. (2019). Postbiotics: facts and open questions. A position paper on the need for a consensus definition. *Beneficial microbes*, 10 (7), 711-719.
- [24] Cuevas-González, P., Liceaga, A., Aguilar-Toalá, J. (2020). Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. *Food research international*, 136, 109502.
- [25] Barros, C.P., Guimaraes, J.T., Esmerino, E.A., Duarte, M.C.K., Silva, M.C., Silva, R., Ferreira, B.M., Sant'Ana, A.S., Freitas, M.Q., Cruz, A.G. (2020). Paraprobiotics and postbiotics: concepts and potential applications in dairy products. *Current Opinion in Food Science*, 32, 1-8.
- [26] Moradi, M., Molaei, R., Guimarães, J.T. (2021). A review on preparation and chemical analysis of postbiotics from lactic acid bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 143, 109722.
- [27] Othman, M.B., Sakamoto, K. (2020). Effect of inactivated *Bifidobacterium longum* intake on obese diabetes model mice (TSOD). *Food Research International*, 129, 108792.
- [28] Kamiya, T., Wang, L., Forsythe, P., Goettsche, G., Mao, Y., Wang, Y., Tougas, G., Bienenstock, J. (2006). Inhibitory effects of *Lactobacillus reuteri* on visceral pain induced by colorectal distension in Sprague-Dawley rats. *Gut*, 55 (2), 191-196.
- [29] Van Hoffen, E., Korthagen, N.M., De Kivit, S., Schouten, B., Bardoel, B., Duivelshof, A., Knol, J., Garssen, J., Willemsen, L.E.M. (2010). Exposure of intestinal epithelial cells to UV-killed *Lactobacillus GG* but not *Bifidobacterium breve* enhances the effector immune response in vitro. *International archives of allergy and immunology*, 152 (2), 159-168.
- [30] Ananta, E., Knorr, D. (2009). Comparison of inactivation pathways of thermal or high pressure inactivated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 by flow cytometry analysis. *Food microbiology*, 26 (5), 542-546.
- [31] Shin, H.S., Park, S.Y., Lee, D.K., Kim, S., An, H.M., Kim, J.R., Kim, M.J., Cha, M.G., Lee, S.W., Kim, K.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.

- [32] Aguilar-Toalá, J., Hall, F., Urbizo-Reyes, U., Garcia, H., Vallejo-Cordoba, B., González-Córdova, A., Hernández-Mendoza, A., Liceaga, A. (2020). In silico prediction and in vitro assessment of multifunctional properties of postbiotics obtained from two probiotic bacteria. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 12 (2), 608-622.
- [33] Nakamura, F., Ishida, Y., Sawada, D., Ashida, N., Sugawara, T., Sakai, M., Goto, T., Kawada, T., 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.
- [34] Tiptiri-Kourpeti, A., Spyridopoulou, K., Santarmaki, V., Aindelis, G., Tompoulidou, E., Lamprianidou, E.E., Saxami, G., Ypsilantis, P., Lampri, E.S., Simopoulos, C. (2016). *Lactobacillus casei* exerts anti-proliferative effects accompanied by apoptotic cell death and up-regulation of TRAIL in colon carcinoma cells. *PloS one*, 11 (2), e0147960.
- [35] Dinić, M., Lukić, J., Djokić, J., Milenković, M., Strahinić, I., Golić, N., Begović, J. (2017). *Lactobacillus fermentum* postbiotic-induced autophagy as potential approach for treatment of acetaminophen hepatotoxicity. *Frontiers in Microbiology*, 8, 594.
- [36] Williams, N.T. (2010). Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 67 (6), 449-458.
- [37] Allen, A.P., Hutch, W., Borre, Y.E., Kennedy, P.J., Temko, A., Boylan, G., Murphy, E., Cryan, J.F., Dinan, T.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-e939.
- [38] Pathmakanthan, S., Li, C.K., Cowie, J., Hawkey, C.J. (2004). *Lactobacillus plantarum* 299: beneficial in vitro immunomodulation in cells extracted from inflamed human colon. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 19 (2), 166-173.
- [39] Liang, S., Wang, T., Hu, X., Luo, J., Li, W., Wu, X., Duan, Y., Jin, F. (2015). Administration of *Lactobacillus helveticus* NS8 improves behavioral, cognitive, and biochemical aberrations caused by chronic restraint stress. *Neuroscience*, 310, 561-577.

- [40] De Vrese, M., Offick, B. (2010). Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea. *Bioactive Foods in Promoting Health*, 205-227.
- [41] Yan, F., Polk, D.B. (2002). Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *Journal of biological chemistry*, 277 (52), 50959-50965.
- [42] Blagodatskaya, E., Kuzyakov, Y. (2013). Active microorganisms in soil: critical review of estimation criteria and approaches. *Soil Biology and Biochemistry*, 67, 192-211.
- [43] Ghanem, K., Badawy, I., Abdel-Salam, A. (2004). Influence of yoghurt and probiotic yoghurt on the absorption of calcium, magnesium, iron and bone mineralization in rats. *Milchwissenschaft*, 59 (9-10), 472-475.
- [44] Rampengan, N.H., Manoppo, J., Warouw, S.M. (2010). Comparison of efficacies between live and killed probiotics in children with lactose malabsorption. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 41 (2), 474-481.
- [45] Kaila, M., Isolauri, E., Soppi, E., Virtanen, E., Laine, S., Arvilommi, H. (1992). Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatric research*, 32 (2), 141-144.
- [46] Kaila, M., Isolauri, E., Virtanen, E., Arvilommi, H. (1992). Preponderance of IgM from blood lymphocytes in response to infantile rotavirus gastroenteritis. *Gut*, 33 (5), 639-642.
- [47] Ogawa, T., Asai, Y., Tamai, R., Makimura, Y., Sakamoto, H., Hashikawa, S., Yasuda, K. (2006). Natural killer cell activities of synbiotic *Lactobacillus casei* ssp. *casei* in conjunction with dextran. *Clinical & Experimental Immunology*, 143 (1), 103-109.
- [48] Dalmaso, G., Cottrez, F., Imbert, V., Lagadec, P., Peyron, J.-F., Rampal, P., Czerucka, D., Groux, H. (2006). *Saccharomyces boulardii* inhibits inflammatory bowel disease by trapping T cells in mesenteric lymph nodes. *Gastroenterology*, 131 (6), 1812-1825.
- [49] Corr, S.C., Li, Y., Riedel, C.U., O'Toole, P.W., Hill, C., Gahan, C.G. (2007). Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (18), 7617-7621.

- [50] Cleusix, V., Lacroix, C., Vollenweider, S., Le Blay, G. (2008). Glycerol induces reuterin production and decreases *Escherichia coli* population in an in vitro model of colonic fermentation with immobilized human feces. *FEMS microbiology ecology*, 63 (1), 56-64.
- [51] Elli, M., Zink, R., Rytz, A., Reniero, R., Morelli, L. (2000). Iron requirement of *Lactobacillus* spp. in completely chemically defined growth media. *Journal of applied microbiology*, 88 (4), 695-703.
- [52] Doron, S., Gorbach, S.L. (2006). Probiotics: their role in the treatment and prevention of disease. *Expert review of anti-infective therapy*, 4 (2), 261-275.
- [53] Silva, M., Jacobus, N., Deneke, C., Gorbach, S. (1987). Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 31 (8), 1231-1233.
- [54] Castagliuolo, I., Riegler, M.F., Valenick, L., LaMont, J.T., Pothoulakis, C. (1999). *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infection and immunity*, 67 (1), 302-307.
- [55] Macintyre, A., Childscymet, T. (2005). Probiotics The benefits of bacterial cultures. *Comprehensive therapy*, 31 (3), 181-185.
- [56] Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M.T., McCormick, J.K. (2003). Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical microbiology reviews*, 16 (4), 658-672.
- [57] Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K., Matošić, S. (2010). Antimicrobial activity—the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 48 (3), 296-307.
- [58] Marteau, P., Shanahan, F. (2003). Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17 (5), 725-740.
- [59] (7 July 2006). Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinin Genel Etiketleme ve Beslenme Yönünden Etiketleme Kuralları Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ. T.C. Resmi Gazete, 34
- [60] Snyderman, D.R. (2008). The safety of probiotics. *Clinical infectious diseases*, 46 (Supplement_2), S104-S111.

- [61] Borriello, S., Hammes, W., Holzapfel, W., Marteau, P., Schrezenmeir, J., Vaara, M., Valtonen, V. (2003). Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. *Clinical infectious diseases*, 36 (6), 775-780.
- [62] Boyle, R.J., Robins-Browne, R.M., Tang, M.L. (2006). Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *The American journal of clinical nutrition*, 83 (6), 1256-1264.
- [63] Salminen, M.K., Tynkkynen, S., Rautelin, H., Saxelin, M., Vaara, M., Ruutu, P., Sarna, S., Valtonen, V., Järvinen, A. (2002). Lactobacillus bacteremia during a rapid increase in probiotic use of Lactobacillus rhamnosus GG in Finland. *Clinical infectious diseases*, 35 (10), 1155-1160.
- [64] Besselink, M.G., van Santvoort, H.C., Buskens, E., Boermeester, M.A., van Goor, H., Timmerman, H.M., Nieuwenhuijs, V.B., Bollen, T.L., van Ramshorst, B., Witteman, B.J. (2008). Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 371 (9613), 651-659.
- [65] Amenyogbe, E., Chen, G., Wang, Z., Huang, J., Huang, B., Li, H. (2020). The exploitation of probiotics, prebiotics and synbiotics in aquaculture: present study, limitations and future directions.: a review. *Aquaculture International*, 28 (3), 1017-1041.
- [66] da Cruz, A.G., Buriti, F.C.A., de Souza, C.H.B., Faria, J.A.F., Saad, S.M.I. (2009). Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 20 (8), 344-354.
- [67] Karimi, R., Mortazavian, A.M., Da Cruz, A.G. (2011). Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. *Dairy science & technology*, 91 (3), 283-308.
- [68] Karimi, R., Mortazavian, A.M., Amiri-Rigi, A. (2012). Selective enumeration of probiotic microorganisms in cheese. *Food microbiology*, 29 (1), 1-9.
- [69] Lafarge, V., Ogier, J.-C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J.-Y., Gruss, A., Delacroix-Buchet, A. (2004). Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied and environmental microbiology*, 70 (9), 5644-5650.
- [70] Park, Y., Koo, H., Kim, S., Hwang, S., Jung, W., Kim, J., Shin, S., Kim, R., Park, Y.H. (2007). The analysis of milk components and pathogenic bacteria

- isolated from bovine raw milk in Korea. *Journal of Dairy Science*, 90 (12), 5405-5414.
- [71] Yuan, L., Sadiq, F.A., Burmølle, M., Wang, N., He, G. (2019). Insights into psychrotrophic bacteria in raw milk: a review. *Journal of food protection*, 82 (7), 1148-1159.
- [72] Wright, A.L., Bauer, M., Naylor, A., Sutcliffe, E., Clark, L. (1998). Increasing breastfeeding rates to reduce infant illness at the community level. *Pediatrics*, 101 (5), 837-844.
- [73] Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M.L., Xaus, J., Fernández, L., Rodríguez, J.M. (2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of pediatrics*, 143 (6), 754-758.
- [74] Lara-Villoslada, F., Olivares, M., Sierra, S., Rodríguez, J.M., Boza, J., Xaus, J. (2007). Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. *British Journal of Nutrition*, 98 (S1), S96-S100.
- [75] Zimmermann, P., Curtis, N. (2020). Breast milk microbiota: A review of the factors that influence composition. *Journal of Infection*, 81 (1), 17-47.
- [76] Tannock, G.W., Lawley, B., Munro, K., Pathmanathan, S.G., Zhou, S.J., Makrides, M., Gibson, R.A., Sullivan, T., Prosser, C.G., Lowry, D., Hodgkinson, A.J. (2013). Comparison of the Compositions of the Stool Microbiotas of Infants Fed Goat Milk Formula, Cow Milk-Based Formula, or Breast Milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (9), 3040-3048.
- [77] Pietrzak-Fiećko, R., Kamelska-Sadowska, A.M. (2020). The comparison of nutritional value of human milk with other mammals' milk. *Nutrients*, 12 (5), 1404.
- [78] Roy, D., Ye, A., Moughan, P.J., Singh, H. (2020). Composition, structure, and digestive dynamics of milk from different species—A review. *Frontiers in Nutrition*, 7, 577759.
- [79] Roos, S., Karner, F., Axelsson, L., Jonsson, H. (2000). *Lactobacillus mucosae* sp. nov., a new species with in vitro mucus-binding activity isolated from pig intestine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50 (1), 251-258.

- [80] Rastogi, S., Mittal, V., Singh, A. (2019). In Vitro Evaluation of Probiotic Potential and Safety Assessment of *Lactobacillus mucosae* Strains Isolated from Donkey's Lactation. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-12.
- [81] Calo-Mata, P., Arlindo, S., Boehme, K., de Miguel, T., Pascoal, A., Barros-Velazquez, J. (2008). Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. *Food and Bioprocess Technology*, 1 (1), 43-63.
- [82] Khalid, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *Int. J. Biosci*, 1 (3), 1-13.
- [83] Salminen, S., Von Wright, A. (2004). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. CRC Press.
- [84] Saeed A, H., Salam A, I. (2013). Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review. *Food and Nutrition Sciences*, 2013
- [85] Stieglmeier, M., Wirth, R., Kminek, G., Moissl-Eichinger, C. (2009). Cultivation of anaerobic and facultatively anaerobic bacteria from spacecraft-associated clean rooms. *Applied and environmental microbiology*, 75 (11), 3484-3491.
- [86] Roy, A., Panja, A.S., Maitra, M., Bandopadhyay, B. (2019). Isolation and Characterizations of Probiotics from Bovine (Cow) Milk.
- [87] Pandey, K.R., Naik, S.R., Vakil, B.V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. *Journal of food science and technology*, 52 (12), 7577-7587.
- [88] Chuayana, E.L., Ponce, C.V., Rivera, M.R.B., Cabrera, E.C. (2003). Antimicrobial activity of probiotics from milk products. *Phil J. Microbiol. Infect. Dis*, 32 (2), 71-74.
- [89] Stiles, M.E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van leeuwenhoek*, 70 (2), 331-345.
- [90] Whittenbury, R. (1964). Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. *Microbiology*, 35 (1), 13-26.
- [91] Vinderola, C.G., Reinheimer, J.A. (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.
- [92] Du Toit, E., Vesterlund, S., Gueimonde, M., Salminen, S. (2013). Assessment of the effect of stress-tolerance acquisition on some basic characteristics of specific probiotics. *International journal of food microbiology*, 165 (1), 51-56.

- [93] Liu, H., Zhang, Y., Yang, J., Liu, Y., Chen, J. (2022). Application of mNGS in the etiological analysis of lower respiratory tract infections and the prediction of drug resistance. *Microbiology Spectrum*, 10 (1), e02502-02521.
- [94] Wayne, P. (2011). Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.
- [95] Edition, A.S.E. (2012). CLSI document M02-A11. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 32 (1), 76.
- [96] Clinical, Institute, L.S. (2014): Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. CLSI Wayne, PA, USA.
- [97] Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., Hildebrandt, B., Müller-Bertling, S., Witte, W., Goossens, H. (2007). Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 59 (5), 900-912.
- [98] Kamruzzaman, M., Jahan, S., Fuadh-Al-Kabir, M., Jahan, M., Rahman, M., Khan, M.A.K., Hossain, M. (2013). The investigation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from cow milk. *Int J Biosci (IJB)*, 3, 161-167.
- [99] Han, W., Mercenier, A., Ait-Belgnaoui, A., Pavan, S., Lamine, F., van Swam, I.I., Kleerebezem, M., Salvador-Cartier, C., Hisbergues, M., Bueno, L. (2006). Improvement of an experimental colitis in rats by lactic acid bacteria producing superoxide dismutase. *Inflammatory bowel diseases*, 12 (11), 1044-1052.
- [100] de LeBlanc, A.d.M., LeBlanc, J.G., Perdigon, G., Miyoshi, A., Langella, P., Azevedo, V., Sesma, F. (2008). Oral administration of a catalase-producing *Lactococcus lactis* can prevent a chemically induced colon cancer in mice. *Journal of Medical Microbiology*, 57 (1), 100-105.
- [101] Kapila, S., Sinha, V.P. (2006). Antioxidative and hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus casei* ssp *casei* (biodefensive properties of lactobacilli). *Indian journal of medical sciences*, 60 (9), 361-370.
- [102] Hoffmann, A., Kleniewska, P., Pawliczak, R. (2021). Antioxidative activity of probiotics. *Archives of Medical Science: AMS*, 17 (3), 792.
- [103] Martín, R., Olivares, M., Pérez, M., Xaus, J., Torre, C., Fernández, L., Rodríguez, J.M. (2010). Identification and evaluation of the probiotic potential

- of lactobacilli isolated from canine milk. *The Veterinary Journal*, 185 (2), 193-198.
- [104] Monteagudo-Mera, A., Rodríguez-Aparicio, L., Rúa, J., Martínez-Blanco, H., Navasa, N., García-Armesto, M.R., Ferrero, M.Á. (2012). In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *Journal of functional foods*, 4 (2), 531-541.
- [105] Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A., Poznanski, E. (2009). Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International dairy journal*, 19 (1), 3-11.
- [106] Marhamatizadeh, M.H., Sayyadi, S. (2019). Mining of lactic acid bacteria from traditional yogurt (Mast) of Iran for possible industrial probiotic use. *Italian Journal of Animal Science*, 18 (1), 663-667.
- [107] Vanderhoof, J.A., Young, R. (2008). Probiotics in the United States. *Clinical infectious diseases*, 46 (Supplement_2), S67-S72.
- [108] Demarigny, Y., Beuvier, E., Dasen, A., Duboz, G. (1996). Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses./Evolution of microflora during ripening and characterization of facultatively heterofermentative lactobacilli. *Le Lait*, 76 (4), 371-387.
- [109] CLSI, C. (2012). M100-S25: performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Twenty-Fifth Informational Supplement*,
- [110] Reuben, R., Roy, P., Sarkar, S., Alam, A.R.U., Jahid, I. (2020). Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties. *Journal of dairy science*, 103 (2), 1223-1237.
- [111] Vibhute, V., Shelke, R., Chavan, S., Nage, S. (2011). Effect of probiotics supplementation on the performance of lactating crossbred cows. *Veterinary World*, 4 (12), 557.
- [112] Jose, N.M., Bunt, C.R., Hussain, M.A. (2015). Comparison of microbiological and probiotic characteristics of lactobacilli isolates from dairy food products and animal rumen contents. *Microorganisms*, 3 (2), 198-212.
- [113] Furtula, V., Jackson, C.R., Farrell, E.G., Barrett, J.B., Hiott, L.M., Chambers, P.A. (2013). Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated from environmental samples in an area of intensive poultry production. *International journal of environmental research and public health*, 10 (3), 1020-1036.

- [114] Hernández-González, J.C., Martínez-Tapia, A., Lazcano-Hernández, G., García-Pérez, B.E., Castrejón-Jiménez, N.S. (2021). Bacteriocins from lactic acid bacteria. A powerful alternative as antimicrobials, probiotics, and immunomodulators in veterinary medicine. *Animals*, 11 (4), 979.
- [115] Luz, C., Calpe, J., Quiles, J.M., Torrijos, R., Vento, M., Gormaz, M., Mañes, J., Meca, G. (2021). Probiotic characterization of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk and employment for the elaboration of a fermented milk product. *Journal of Functional Foods*, 84, 104599.



ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Hüseyin ÖZCAN

Ulusal ve Uluslararası Bilimsel Kongrelerde Sunulan Bildirileri

- 2009, *Poster bildirisi*, Bahri Patır, Özkan Kanay, Hüseyin Özcan, Uğur Uluişık, *Somatic cell counts in raw cow milk used in the production in Elazığ*, 11th International Veterinary Medicine Students Scientific Research Congress, İstanbul, Turkey.

Araştırma Projeleri

- Anadolu Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projesi, Meralarda Beslenen İneklerin Sütlerinden Probiyotik Mikroorganizmanın İzolasyonu ve Tanımlanması, 2021-2022.