



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



Yüksek Lisans Tezi

**TÜRKİYE'DEKİ BAZI GELENEKSEL PROBİYOTİK
İÇECEKLERİN ANTİMİKROBİYAL ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Oluwaseun Temitope ALADEBOYEJE

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programı

**DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Nazmiye Özlem ŞANLI**

Temmuz, 2019

İSTANBUL

Bu çalışma, 24.07.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Dr. Öğr. Üyesi Nazmiye Özlem ŞANLI(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Ayten KİMİRAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ
Gebze Teknik Üniversitesi
Temel Bilimler Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, 31246 numaralı İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca danışmanlığımı üstlenen, hayat tecrübesi ve bilgileriyle bana yol gösteren, sabrını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Nazmiye Özlem ŞANLI'ya;

Desteklerini esirgemeyen Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ayten KİMİRAN'a, Dr.Öğr. Üyesi Elif Özlem ARSLAN AYDOĞDU'ya ve tez deneyleri süresince desteğini esirgemeyen bütün hocalarıma;

Deneyleerde bana gereken cihazı kullanmama izin verip yardımcı olan Moleküler Biyoloji ve Genetik anabilim dalındaki Arşt. Gör. Merve YILMAZER'e;

Bana hayallerimin peşinden gitmeyi öğreten ve bu yolda ilerlerken benim için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan sevgili annem ve babama;

Yüksek lisans eğitimim boyunca karşılaştığım bütün zorluklarda sevgisi ile manen yanımda olan ve sonsuz bir sabırla bana her konuda destek olan eşim Zainab Abimbola ALADEBOYEJE'ye;

Uzaklardan bana hep destek veren kardeşime, tez deneylerim sırasında ellerinden gelen bütün desteği veren şahıslara,

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve en büyük destekçim güzel aileme sonsuz teşekkür ederim.

Temmuz 2019

Oluwaseun Temitope ALADEBOYEJE

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	x
ÖZET	xi
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. FONKSİYONEL GIDALAR.....	3
2.2. PROBİYOTİK KAVRAMI	4
2.2.1. Prebiyotikler ve Sinbiyotikler.....	7
2.2.2. Fonksiyonel Gıda Piyasasında Probiyotiklerin Durumu	7
2.2.3. İnsanlarda Probiyotiklerin Kullanımı ve Güvenliği	10
2.2.4. Probiyotik Mikroorganizmaların Özellikleri ve Seçilme Kriterleri	11
2.2.5. Probiyotiklerin Etki Mekanizmaları	11
2.2.5.1. Bağırsaklara Tutunma ve Kolonizasyon.....	11
2.2.5.2. Besinler için Rekabet ve Antimikrobiyal Maddelerin Üretimi.....	11
2.2.5.3. Mukozal ve Sistemik Konakçı Bağışıklığının Uyarılması	12
2.2.6. Probiyotikler Tarafından Üretilen Antimikrobiyal Bileşikler	12
2.3. TÜRKİYE'YE ÖZGÜ FERMENTE PROBİYOTİK İÇECEKLER	14
2.3.1. Çalışmada Kullanılan Türk Fermente İçecekleri.....	14
2.3.1.1. Boza	16
2.3.1.2. Kefir	16
2.3.1.3. Hardaliye	17
2.3.1.4. Ayran.....	17
2.3.1.5. Şalgam Suyu.....	17
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	19
3.1. İÇECEKLERDEN PROBİYOTİK MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU	19

3.2. PROBİYOTİK İZOLATLARIN SAKLANMASI.....	19
3.3. PROBİYOTİK SUŞLARIN İDENTİFİKASYON VE KARAKTERİZASYONU	20
3.3.1. Morfolojik Karakterizasyon	20
3.3.1.1. <i>Gram Boyama</i>	20
3.3.1.2. <i>Katalaz Testi</i>	20
3.3.2. Genotipik Teknik ile İzolatların Tanımlanması	20
3.3.2.1. <i>Büyük Kalıplar için Optimize Edilmiş Dizileme Reaksiyonu</i>	21
3.4. İZOLATLARIN ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRMESİ	22
3.4.1. Probiyotik İzolatların Süpernatantın Hazırlanması	22
3.4.2. Antimikrobiyal Etkinlik Değerlendirmesinde Kullanılan Mikroorganizmalar	23
3.4.3. Nokta Damlatma Yöntemi.....	23
3.4.4. Agar Kuyu Difüzyon Yöntemi	24
3.5. DENEYLERDE KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASALLAR	25
3.5.1. Kullanılan Besiyerleri.....	25
3.5.1.1. <i>de Man Rogosa Sharpe (MRS Agar)</i>	25
3.5.1.2. <i>Bifidus Selective Medium (BSM Agar; Sigma-Aldrich)</i>	25
3.5.1.3. <i>M 17 Agar, TERZAGHI</i>	26
3.5.1.4. <i>Trypton Soy Broth (Sigma-Aldrich/Merck)</i>	26
3.5.1.5. <i>Tryptic Soy Agar</i>	27
3.5.1.6. <i>Sabouraud 4% Dextrose Agar (Merck)</i>	27
3.5.1.7. <i>Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD Broth; Himedia)</i>	27
3.5.1.8. <i>Mueller Hinton Agar (MHA)</i>	27
3.5.2. Kullanılan Kimyasallar.....	28
3.5.2.1. <i>McFarland Çözeltisi</i>	28
3.5.2.2. <i>Katalaz Çözeltisi</i>	28
3.5.2.3. <i>% 0.5 Peptonlu Su</i>	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. PROBİYOTİK İÇECEKLERDEN MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU VE İDENTİFİKASYONU.....	29
4.1.1. Moleküler Tiplendirme.....	32
4.2. PROBİYOTİK İZOLATLARIN ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	32
4.2.1. İzolatların Antimikrobiyal Aktivitesinin Nokta-Damlatma Yöntemi ile Değerlendirilmesi	32
4.2.2. İzolatların Antimikrobiyal Aktivitesinin Agar Kuyu Diffüzyon Yöntemi ile Değerlendirilmesi	38

5. TARTIşMA VE SONUÇ	42
KAYNAKLAR.....	46
EKLER	55
ÖZGEÇMİş	56



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Fonksiyonel gıdaların sınıflandırılması (Homayouni ve diğ., 2012a).....	4
Şekil 4.1: İzole edilen probiyotik organizmalara ait Gram boyama görüntüleri	31
Şekil 4.2: Ticari prebiyotik Türk fermente içeceklerinden elde edilen probiyotik izolatların Spot-on-Lawn (Nokta-Damlatma) metoduyla Gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyel etkisini gösteren temsilci fotoğraflar.....	35
Şekil 4.3: Ticari prebiyotik Türk fermente içeceklerinden elde edilen probiyotik izolatların Spot-on-Lawn (Nokta-Damlatma) metoduyla Gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel etkisini gösteren temsilci fotoğraflar.....	36
Şekil 4.4: Ticari prebiyotik Türk fermente içeceklerinden elde edilen probiyotik izolatın (B7) Spot-on-Lawn (Nokta-Damlatma) metoduyla <i>C. albicans</i> antifungal etkisini gösteren temsilci fotoğraf.....	37
Şekil 4.5: Agar kuyu diffüzyon yöntemiyle izolatların antibakteriyel etkisi.....	40
Şekil 4.6: <i>Candida albicans</i> 'a karşı izolatların antifungal etkisi.....	41

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Genel olarak tanımlanan probiyotik mikroorganizmalar (Kaur ve diğ., 2002; Senok ve diğ., 2005; Shah, 2007; de Vrese ve Schrezenmeir, 2008; Ranadheera ve diğ., 2017).....	8
Tablo 2.2: Ticari ürünlerde kullanılan probiyotik bakteri suşları (Yeung ve diğ., 1999; Mercenier ve diğ., 2003; Prado ve diğ., 2008; Vasiljevic ve Shah, 2008; Figueroa-González ve diğ., 2011).....	9
Tablo 2.3: Fermente geleneksel Türk probiyotik içeceklerinin özeti (Baschali ve diğ., 2017).....	15
Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan indikatör suşlar.....	23
Tablo 4.1: Çalışmamızda analizi yapılan geleneksel Türk probiyotik içeceklerinden izole edilen mikroorganizmalar.....	30
Tablo 4.2: Çalışmamızda 16S rRNA dizi analizi ile moleküler tiplendirme ile isimlendirilen Türk probiyotik içeceklerinden izole edilen mikroorganizmalar.....	32
Tablo 4.3: Standart patojenlere karşı izolatların antimikrobiyal aktivitesi (Spot-on-Lawn Yöntemi)	33
Tablo 4.4: Standart patojenlere karşı izolatların antimikrobiyal aktivitesi (Agar Oluk Diffüzyon Yöntemi).....	38

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

cm	: Santimetre
g/L	: Gram/Litre
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
rpm	: Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı)

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

AB	: Avrupa Birliği
ADA	: American Dietetic Association
ATCC	: American Type Culture Collection (Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu)
BLIS	: Bacteriocin-Like Inhibitory Substances (Bakteriyosin-benzeri inhibe edici maddeler)
FAO	: Food and Agricultural Organization (Gıda ve Tarım Örgütü)
FDA	: Food and Drug Administration (ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA))
FOSHU	: Foods for Specified Health Use (Sağlık Kullanımına Yönelik Özel Gıdalar)
GRAS	: Generally Regarded as Safe (Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen)
KOB	: Koloni Oluşturan Birim
TFC	: Turkish Food Codex (Türk Gıda Kodeksi)
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TÜRKİYE’DEKİ BAZI GELENEKSEL PROBİYOTİK İÇECEKLERİN ANTİMİKROBİYAL ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Oluwaseun Temitope ALADEBOYEJE

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Nazmiye Özlem ŞANLI

İyi beslenmeyi teşvik etmek, sağlığı iyileştirmek ve hastalık riskini azaltmak için geliştirilen fonksiyonel gıdaların tipik bir örneği probiyotik ürünlerdir. Probiyotik ürünler antikarsinojenik, antimutagenik, kolesterol düşürme, laktoz intoleransını azaltma, bağışıklık sisteminin modülasyonuna yardımcı olma gibi özelliklere sahiptir. Bu yararlı faaliyetlerinin yanısıra ticari ürün olarak seçilmelerinde en önemli kriter olan antimikrobiyal aktiviteye sahiptirler.

Probiyotik organizmalar organik asitler, hidrojen peroksit ve bakteriyosinler gibi farklı antimikrobiyal metabolitlerin sentezi vasıtasıyla patojenleri inhibe edip faydalı sağlık etkilerini göstermektedir.

Dünya genelinde, fonksiyonel gıda pazarının önemli bir kısmını probiyotik gıdalar oluşturmaktadır. Birkaç çalışmada, geleneksel Türk içeceklerinin mikrobiyota bileşimi ve bunların probiyotik özellikleri rapor edilmekle beraber, bu içeceklerin probiyotik içeriğinin antimikrobiyal aktivite değerlendirmelerine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, Çalışmamızda boza, kefir, ayran, şalgam suyu ve hardaliye olmak üzere beş farklı geleneksel fermente Türk içeceğinin mikrobiyal kompozisyonu incelenerek, bu içeceklerden elde edilen mikroorganizmaların bazı standart insan patojenik bakteri ve mantar suşları üzerine antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir.

Probiyotik organizmaların izolasyonu için seri sulandırılmış içecek örneklerinden *Lactobacillus* bakterileri için deMan Rogosa ve Sharpe (MRS) besiyerine; Bifidobakteriler için *Bifidobacterium* Selective Medium (BSM) besiyerine, Laktik streptokok bakterileri için M17 Agar besiyerine ve mayalar için Sabouraud Dextrose Agar (SDA) besiyerlerine ekim yapılmıştır. MRS ve BSM besiyerleri anaerobik koşullarda 37  C'de 72 saatlik inkübasyonla izole edilmiştir. M17 ve SDA ise 28-30  C'de 72 saatlik inkübasyonla aerobik koşullarda izole edilmiştir.

Morfolojik olarak karakterize edilen bakteri izolatları Bakteriyel Yapay Kromozom (BAC) DNA'dan veri dizileme ile tanımlanmıştır. Mikrobiyal analizi yapılan içecek örneklerinden izole edilen 22 tane probiyotik organizmanın seçilmiş yaygın insan patojenleri üzerine antimikrobiyal etkisi, spot-on-lawn (nokta-damlatma ekim) ve agar kuyu difüzyon yöntemleri ile değerlendirilmiştir. İzole edilen 18 adet farklı probiyotik izolatın, test edilen patojenlere karşı çeşitli derecede antagonistik etki gösterdiği belirlenmiştir. İzolatlar arasında, en güçlü antimikrobiyal etkiyi boza ve kefirten izole edilen probiyotik suşlar göstermiştir.

Antimikrobiyal etkinin belirlenmesinde “spot-on-lawn (nokta-damlatma ekim)” yönteminin daha etkin olduğu tespit edilmiştir. Diğer yandan, antimikrobiyal aktivite göstermeleri probiyotiklerin seçilmesinde en önemli kriterlerden biri olmakla beraber, bu organizmaların probiyotik katkı olarak kullanımı için tek başına yeterli değildir. İleri çalışmalarda diğer probiyotik özelliklerinin incelenmesi gerekmektedir.

Temmuz 2019, 70 sayfa.

Anahtar kelimeler: Probiyotik, Fonksiyonel gıdalar, Antimikrobiyal aktivite, Fermente geleneksel Türk içecekleri, Türkiye

SUMMARY

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION OF THE ANTIMICROBIAL EFFICACY OF SOME TRADITIONAL TURKISH PROBIOTIC BEVERAGES

Oluwaseun Temitope ALADEBOYEJE

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Assist. Prof. Dr. Nazmiye Özlem ŞANLI

Functional foods have been developed in order to promote good nutrition, improve health, and reduce disease risk, and probiotics-containing products are a typical example of these functional foods. Probiotic products have anticarcinogenic, antimutagenic, cholesterol lowering, lactose intolerance alleviation effect, and help to modulate the immune system. Besides these beneficial activities, they also have antimicrobial activity which is one of the most important selection criteria for their use in commercial products.

Probiotic organisms exhibit beneficial health effects by inhibiting pathogens through the synthesis of various antimicrobial metabolites such as organic acids, hydrogen peroxide and bacteriocins.

Probiotic foods constitute a significant part of the functional foods market worldwide. A number of studies have been reported to evaluate the microbiota composition of fermented traditional Turkish beverages and their probiotic properties, but no studies have been encountered which evaluate the antimicrobial activity of the probiotic contents of these beverages.

Therefore in our study, microbial compositions of five different fermented traditional Turkish beverages namely boza, kefir, ayran, shalgam juice and hardaliye were examined and the antimicrobial activities of the isolates against standard human pathogens were evaluated.

The beverage samples were diluted to 10^{-6} by a ten-fold serial dilution using % 0,5 sterile peptone water. Aliquots were taken from the serially diluted samples and plated on the appropriate selective media for the isolation of probiotic microorganisms. deMan Rogosa and Sharpe (MRS) agar for lactobacilli; *Bifidobacterium* Selective Medium (BSM) agar for bifidobacteria; M17 agar for lactic streptococci, and Sabouraud Dextrose Agar (SDA) was used for yeast isolation. Lactic acid bacteria and bifidobacteria were isolated under anaerobic conditions at 37 °C with 72 hours incubation in an anaerobic jar containing GasPak. Lactic streptococci and yeasts were isolated at 28-30 °C under aerobic conditions with 72 hours and 3-5 days incubation respectively.

A total of 22 presumptive probiotic microorganisms were isolated from the analysed beverage samples. The bacterial isolates were confirmed to be catalase negative and Gram positive. They were further identified by bacterial artificial chromosome (BAC) data sequencing technique. The morphologically characterized pure isolates were stored at -20 ve -86 ° C in the presence of % 20 glycerol in their respective broth culture media until antimicrobial analyses.

The antimicrobial effects of the probiotic isolates against selected common human pathogens were assessed using two different methods viz. spot-on-lawn and agar well diffusion assays. Eighteen isolates displayed varying degrees of antagonistic effects against the tested pathogens. Amongst the obtained isolates, the strongest antimicrobial effects were exhibited by those probiotic strains isolated from boza and kefir.

Spot-on-lawn method was found to be more effective than the agar well diffusion method in the evaluation of antimicrobial effects. Although antimicrobial activity is one of the most important criteria in the selection of probiotics, it is not sufficient for their use as probiotic additives. Other probiotic selection properties should be examined in further studies.

July 2019, 70 pages.

Keywords: Probiotics, Functional foods, Antimicrobial activity, Fermented traditional Turkish beverages, Turkey

1. GİRİŞ

Dünya genelinde insanlar lezzetli gıdalar kadar sağlığa olumlu etki sağlayan fonksiyonel gıdalara da ihtiyaç duymaktadır. Avrupa Birliği (AB)'nin ortak eylemine göre, “Bir gıdanın, beslenme etkisinin ötesinde, vücuttaki bir veya daha fazla hedef fonksiyonu faydalı bir şekilde ve yeterince etkilediği ve/veya hastalık riskini azalttığı kanıtlanmışsa, fonksiyonel gıda olarak kabul edilebilir”. Bu fonksiyonel gıdalar geleneksel yiyecekler, zenginleştirilip, geliştirilerek modifiye edilmiş yiyecekler, tedavi edici yiyecekler ve özel diyet kullanımına yönelik yiyecekleri kapsamaktadır (Diplock ve diğ., 1999; ADA, 2009). Bu fonksiyonel gıdalar arasında da, yararlı mikroorganizma içeren probiyotik gıdaların, en dikkat çeken ve geniş grubu olduğu ve insan hayatının sürdürülmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Probiyotik fonksiyonel gıdalar, insan sağlığına olumlu etkisi nedeni ile ilk sırada tercih edilmektedir (Homayouni ve diğ., 2012a).

Faydalı ve zararlı mikroorganizmalar arasındaki oran, konakçı sağlığını önemli ölçüde etkilediğinden, insan bağırsağındaki mikrobiyal denge çok önemlidir. Probiyotik hücreleri bağırsakta belli bir seviyede tutmanın bir yolu, bu bakterileri içeren probiyotik yiyeceklerin düzenli tüketimi yoluyla bağırsağa probiyotik girişini sağlamaktır. Probiyotik hücre miktarını bağırsakta korumanın bir başka yolu da, prebiyotiklerin düzenli tüketilmesidir. Son yıllarda, probiyotik bakteriler, besin takviyesi olarak süt ürünlerine giderek daha fazla dahil edilmiştir (Homayouni ve diğ., 2012b).

Probiyotik ürünlerin antimikrobiyal aktivite, gastrointestinal enfeksiyonların tedavisi, akut diyare, antibiyotikle ilişkili diyare ve rotaviral diyare dahil olmak üzere insan sağlığı üzerinde bir takım yararlı etkileri olduğu bilinmektedir. Dahası, probiyotikler laktoz intoleransının azaltılmasına, enflamatuar bağırsak hastalıklarının önlenmesine ve tedavisine yardımcı olup anti-*Helicobacter pylori* aktivitesine, antikarsinojenik ve antimutagenik özelliklere sahiptir. Ayrıca, probiyotikler serum kolesterolünün azaltılması ve bağışıklık sisteminin modülasyonuna yardımcı olduğu gibi, azoredüktaz ve nitroredüktaz gibi bazı kolonik enzimlerin aktivitesini azaltmaktadır (Ambalam ve diğ., 2011).

Birkaç çalışmada, geleneksel Türk içeceklerinin mikrobiyota bileşimi ve bunların probiyotik özellikleri rapor edilmekle beraber (Hancıoğlu ve Karapınar, 1997; Gotcheva ve diğ., 2000; Arici ve Coskun, 2001; Garrote ve diğ., 2001; Simova ve diğ., 2002; Yüksekdağ ve diğ., 2004; Witthuhn ve diğ., 2005; Kocak ve Avsar, 2009; Kivanc ve diğ., 2011; Tangüler ve Erten, 2012; Dogan ve Özpınar, 2017), literatürde bu içeceklerin probiyotik içeriğinin antimikrobiyal aktivite değerlendirmelerine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, çalışmamızda Türk probiyotik içecekleri şalgam suyu, hardaliye, boza, kefir ve ayranın mikrobiyal kompozisyonu incelenerek, bu içeceklerden elde edilen mikroorganizmaların bazı standart insan patojeni bakteri ve mantar suşları üzerine antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir.



2. GENEL KISIMLAR

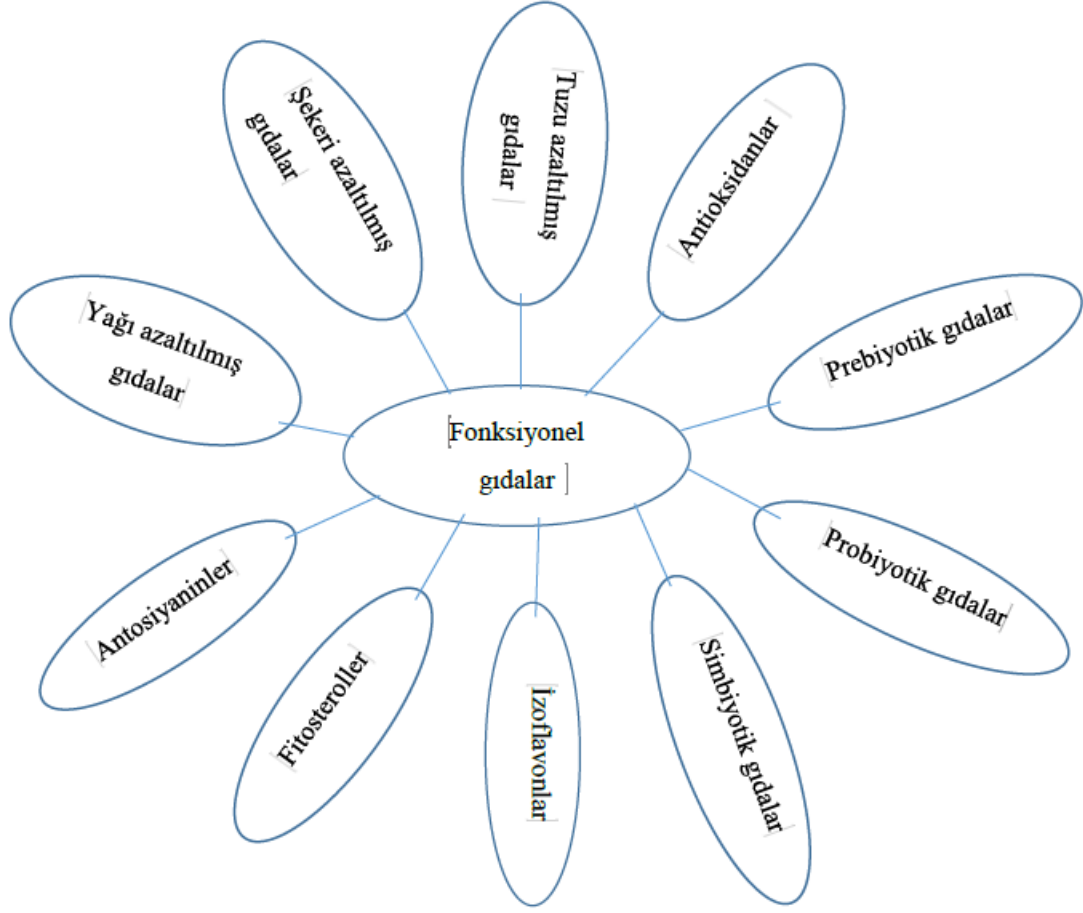
2.1. FONKSİYONEL GIDALAR

Gıdaların ana rolü tüketiciye memnuniyet ve sağlık hissi verirken, insan vücudundaki metabolik gereklilikleri karşılamak için yeterli enerjiyi sağlamaktır (Homayouni, 2008). Bununla birlikte, beslenme gereksinimlerinin karşılanmasının ötesinde, besinler farklı fizyolojik işlevlere sahip olabilir ve bazı hastalıklarda zararlı veya yararlı rol oynayabilir (Koletzko ve diğ., 1998). İyi beslenmeyi teşvik etmek, sağlığı iyileştirmek ve hastalık riskini azaltmak için fonksiyonel gıdalar geliştirilmiştir. “Fonksiyonel gıda”, besin değerinin ötesinde hastalık önleyici ve/veya iyileştirici etkileri olan, reçetesiz bir terapötik yardım olarak kabul edilebilir özel gıdalar anlamına gelir (Hasler, 2002; Homayouni, 2008).

Bu bakımdan da fonksiyonel gıdalarla sıklıkla kullanılan diğer terimler “biyoterapötikler” ve “nutrasötikler”dir. Biyoterapötik terimi ile memeli hücreleri, virüsler ve bakteriler gibi canlı organizmalar tarafından üretilen proteinler ve diğer maddeler; nutrasötik terimi ile ekstre veya gıda olarak kronik bir hastalığa karşı koruyucu veya fizyolojik yarar gösteren ürünler ifade edilmektedir. Sağlık üzerine kanıtlanan etkileri nedeni ile, fonksiyonel gıdalar konusunda in vitro ve in vivo araştırmalar her geçen gün küresel olarak artmaktadır (Hasler, 2002).

Gıdaların tedavi edici faydalar sağlayabileceği yeni bir kavram değildir. “Gıda ilacınız ve ilaç gıdanız olsun” kavramı, yaklaşık 2500 yıl önce tıbbın babası Hipokrat tarafından benimsenmiştir. Fakat, “ilaç olarak gıda” felsefesi, 19. yüzyılda modern ilaç tedavilerinin ortaya çıkışıyla nispeten belirsiz kalmıştır. 1900’lerde, hastalıkların önlenmesi ve sağlık desteği olarak beslenmenin önemi tekrar gündeme gelmiştir. Fonksiyonel gıda kavramı ilk olarak 1980’lerde Japonya’da geliştirilmiştir. Japon Sağlık ve Sosyal Yardım Bakanlığı, artan sağlık bakım maliyetlerini kontrol altına almak, yaşam kalitesinin geliştirilmesi ve nüfustaki yaşlıların ortalama yaşam süresinin uzatılması amacıyla fonksiyonel gıdaların resmi olarak onay politikasını başlatmıştır. 1991 yılından itibaren bu gıdalar “sağlık kullanımına yönelik özel gıdalar “Foods for Specified Health Use” (FOSHU) olarak adlandırılmaktadır (Arai, 1996). Temmuz 2002 itibariyle Japonya’da yaklaşık 300 fonksiyonel gıda ürününe “sağlık kullanımına

yönelik özel gıda” onayı verilmiştir (Hasler, 2002). Çeşitli fonksiyonel gıda türleri, Şekil 2.1'de kısaca sınıflandırılmaktadır.



Şekil 2.1: Fonksiyonel gıdaların sınıflandırılması (Homayouni ve diğ., 2012a)

2.2. PROBİYOTİK KAVRAMI

Yunanca “yaşam için” anlamına gelen probiyotikler, yeterli miktarlarda uygulandığında konakta bir sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (FAO/WHO, 2001).

Laktik asit fermentasyonunun insan sağlığı üzerindeki yararlı etkileri konusundaki bilgiler tarih öncesi devirlere dayanmaktadır. İncil, Yaratılış 18: 8’de İbrahim’in fermente ekşi süt tükettiğini ve konuklarına ikram ettiğini belirtmektedir. Tarih öncesi devirlerdeki insanların uzun ömürlü olmaları kısmen veya tamamen fermente edilmiş probiyotik ürünlerin normal tüketimlerine

atfedilmektedir. Ayrıca, ilk defa Mezopotamya'da üretilen Türk kökenli yoğurdun, tarihçesi de beş bin yıl öncesine dayanmaktadır. Bazı kayıtlar M.Ö. 2000 ile 3000 yılları arasında süt, tereyağı ve peynir gibi fermente süt ürünlerinin Mısırlılar, Hintliler, Yunanlılar ve Romalılar gibi farklı toplumlarda yaygın olarak kullanıldığını göstermiştir (Caramia ve diğ. 2008). Eski Yunanistan ve Roma'da, çocuklar ve nekahat dönemindekiler için fermente süt tüketimi önerildiği bilinmektedir. Büyük Pliny adlı Roman doğa araştırmacı da bağırsak sorunlarını tedavi etmek için fermente süt tüketimini önermiştir.

Paris, Pasteur Enstitüsü'nde çocuk doktoru ve araştırmacı olan Henry Tissier, sindirim sistemlerinde bol bifidobakteriye sahip bebeklerin daha az diyare problemi ve gastrointestinal sorun yaşadıklarını bildirmiştir. Aksine, diyareli çocukların dışkılarında bifidobakterilerin sayısının az olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla, sağlıklı bir bağırsak florasının onarılmasına yardımcı olmak için bu bakterilerin diyare hastalarına uygulanabileceğini öne sürmüştür (Tissier, 1906).

Yine Pasteur Enstitüsü'nde çalışan immünolog Eli Metchnikoff, laktik asit bakterilerinin (LAB) bağırsak otointoksikasyonuna karşı bir tür koruma sağladığını öne sürmüştür. Metchnikoff, bağırsak hastalıklarını iyileştirmek için yararlı mikroplar ile zararlı mikropların ikame edilebileceğini tespit eden araştırmasıyla 1908 yılında tıp alanında Nobel Ödülü almıştır. Bulgaristan'ın kırsal kesiminde yaşayan bireylerin şiddetli yoksulluk ve elverişsiz iklim koşullarına rağmen, zengin Avrupalılara nazaran uzun yaşadıklarını ve fermente süt ürünlerini düzenli olarak içtiklerini tespit etmiştir. Metchnikoff, fermente süt ürünlerinde bulunan laktik asit bakterilerinin bağırsaktaki toksin üreten bakterilerin azalmasına sağladığını ve bu durumun da konakçının ömrünü uzattığı hipotezini öne sürmüştür. Bu hipotez günümüzdeki probiyotik kavramı temelini oluşturmuştur (Metchnikoff, 1908).

Yüzlerce mikrobiyal tür insanlarla ilişkili olarak ciltte, ağızda, bağırsak ve vajinal yollarda yaşamaktadır. Bakteriyel popülasyonların insan vücudunun tüm bölgelerinde 10^{14} hücreye ulaştığı tahmin edilmektedir (Tannock, 1994; Mountzouris ve Gibson, 2003). İnsan bağırsağındaki mikrobiyal hücrelerin sayısı, yetişkin vücudundaki hücrelerin sayısından 10 kat daha fazladır (Mountzouris ve Gibson, 2003).

İnsan bağırsak sistemi, karmaşık bir mikroorganizma ekosistemi içerir. Gastrointestinal sistemde 400'den fazla bakteri türü bulunup, kolonik materyalin net ağırlığının yarısı bakteriyel

hücrelerden kaynaklanmaktadır (Tannock, 1999). Kalın bağırsaktaki (kolon) bakteri popülasyonu çok yüksektir ve 10^{12} kob (koloni oluşturan birim)/g sayısına ulaşabilir. İnce bağırsakta bakteri içeriği sadece 10^4 – 10^8 kob/g seviyede oldukça düşüktür. Mide suyunun düşük pH'ya sahip olması nedeniyle, mide suyunda sadece 10^1 – 10^3 kob/ml bakteri bulunmaktadır (Tannock, 1999; Lourens-Hattingh ve Viljoen, 2001b).

İnsan bağırsağındaki mikrobiyota dinamiktir ve insan gelişimi sırasında değiştiği bilinmektedir. Yaşlanmadan kaynaklanan değişikliklere ek olarak, bireyin genetik geçmişi, beslenme alışkanlıkları ve sağlık durumuna bağlı olarak da mikrobiyota içeriği değişebilir. Örneğin, antibiyotiklerin kullanımı, bağırsak mikrobiyotasının dengesine zarar verebilir; hatta bifidobakterilerin ve laktobasillerin sayısının azaltılmasına ve klostridia'nın artmasına neden olabilir. Bu dengesizlik devam ederse yaşlılar ve bağışıklık yetersizliği olan kişilerde diyareye neden olabilir (de Carvalho ve diğ., 2012).

Sağlıklı bir konakçıda, bağırsak mikrobiyota üyeleri arasında potansiyel patojenik ve patojen olmayan organizmalar arasında bir denge vardır. Bakteri enfeksiyonu durumunda bu denge bozulabilir ve mikrobiyal bileşimde sıklıkla dramatik değişikliklere yol açabilir. Bakteriyel enfeksiyonların çoğu için, spesifik olmayan (geniş spektrumlu) antibiyotikler kullanılarak hem patojenik hem de patojenik olmayan üyeler öldürülür. Bu olay sağlıklı bağırsak mikrobiyotasının onarımında ciddi bir gecikmeye yol açabilir. Yaşam boyunca sağlıklı ve dengeli bağırsak mikrobiyotasının sürdürülmesi, sağlığın korunması ve uzun ömürlülüğe yardımcı olduğu düşünüldüğünden bağırsak mikrobiyota dengesinin onarımı son derecede önemlidir (Reid ve diğ., 2011).

Bağırsak mikrobiyotası ve bunların etkileşimleri hakkındaki bilgi, bağırsakta bulunan normal bakterilerin uyarımı ve korunmasına yönelik gıda stratejilerinin geliştirilmesine yol açmıştır (Gibson ve Fuller, 2000). Probiyotikler, ekosistemdeki diğer bakterilere karşı rekabet avantajı göstermesi koşuluyla bağırsak mikrobiyotasının bileşimini seçici olarak modifiye edebilmektedir (Crittenden, 1999). Başka bir deyişle, bağırsak mikrobiyota dengesini geliştirmeye yardımcı olmak, tercih edilen mikroorganizmaların büyümesini teşvik etmek, potansiyel olarak zararlı bakterileri uzaklaştırmak ve vücudun doğal savunma mekanizmalarını güçlendirmek için, insan diyetine probiyotik mikroorganizmalar ve prebiyotikler eklenebilir (Homayouni, 2008; Homayouni ve diğ., 2012b; de Carvalho ve diğ., 2012). *Lactobacillus* ve

Bifidobacterium cinsi bakteriler, fermente edilmiş ve fermente edilmemiş ürünlerin üretiminde kullanılan en yaygın probiyotik bakteriyel hücrelerdir (Homayouni ve diğ., 2012b).

2.2.1. Prebiyotikler ve Sinbiyotikler

Prebiyotik ve sinbiyotik, probiyotiklerle ilişkili tamamlayıcı iki terimdir. Prebiyotikler, gastrointestinal sistemde bulunan sınırlı sayıdaki yararlı mikroorganizma aktivitesinin ve/veya büyümesinin uyarılması yoluyla konakçının sağlık durumunu iyileştiren sindirilmeyen gıda bileşenleridir (Gibson ve Roberfroid, 1995). Her ne kadar prebiyotikler bazı doğal ürünlerde bulunsun da, sağlık ve besin değerlerini iyileştirmek için gıdalara eklenebilir. Kuşkonmaz, muz, hindiba kökü, soğan, sarımsak, domates ve yer elması frukto-oligosakkaritler (FOS) ve laktuloz prebiyotikleri bakımından çok zengindir. Rafinoz ve stakioz prebiyotikleri ise doğal olarak fasulye ve bezelyede bulunmaktadır (Das ve diğ., 2012).

Sinbiyotikler, sinerjik olarak davranan probiyotik ve prebiyotiklerin bir kombinasyonudur ve canlı mikrobiyal besin takviyelerinin konağın gastrointestinal sistemine yerleşimini, sistemde hayatta kalmasını artırarak konağın sağlığını geliştirir (Gibson ve Roberfroid, 1995; Andersson ve diğ., 2001). “*Lactobacillus*+inulin”; “*Bifidobacterium*+*Lactobacillus*+inulin”; “*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*+*Streptococcus* + frukto-oligosakkaritler”; “*Bifidobacterium*+*Lactobacillus*+oligo-fruktoz” beslenmede kullanılan tipik sinbiyotik kombinasyon örnekleridir (Oliveira ve González-Molero, 2016).

2.2.2. Fonksiyonel Gıda Piyasasında Probiyotiklerin Durumu

Son zamanlarda tüm dünyada geliştirilen antioksidanlar, izoflavonlar, fitosteroller, antosiyaninler ile zenginleştirilmiş, yağı/şekeri/tuzu azaltılmış ürünler ve probiyotik, prebiyotik, simbiyotik gıdalar olarak üretilen çok çeşitli fonksiyonel gıda vardır. Bu gıdalar arasında da probiyotik fonksiyonel gıdalar, insan sağlığına olumlu etkisi nedeni ile ilk sırada tercih edilmektedir (Homayouni ve diğ., 2012a).

Son yıllarda 500'den fazla probiyotik gıda ürünü küresel piyasada yer almıştır ve bu sayı her geçen gün artmaktadır (Begum ve diğ., 2017). Günümüzde meyve-sebze suları, süt, ekşi süt, yulaf esaslı ürünler ve dondurmalarda ticari olarak yer alan probiyotikler, bilimsel çevrelerin yanı sıra tüketicilerin de dikkatini çekmektedir (Sveje, 2007; Gupta ve Abu-Ghannam, 2012). Mayonez, et bazlı ürünler, peynir ve peynir bazlı ürünler yeni geliştirilen probiyotikli gıdalardır

(Ong ve diğ., 2006; Morelli, 2007; Sveje, 2007). Dünya genelinde, 2000 yılında 33 milyar dolar olan fonksiyonel gıda pazarı, 2013'te 176.7 milyar dolara yükselmiştir ve toplam gıda pazarının % 5'ini oluşturmaktadır (Hennessy, 2013). Probiyotik gıdaların ise toplam fonksiyonel gıda pazarının yaklaşık % 60-70'ini oluşturduğu tahmin edilmektedir (Kolozyn-Krajewskaa ve Dolatowski, 2012). Tablo 2.1'de genel olarak tanımlanan probiyotik mikroorganizmaların örnekleri gösterilmektedir.

Tablo 2.1: Genel olarak tanımlanan probiyotik mikroorganizmalar (Kaur ve diğ., 2002; Senok ve diğ., 2005; Shah, 2007; de Vrese ve Schrezenmeir, 2008; Ranadheera ve diğ., 2017)

<i>Lactobacillus</i> türü	<i>Bifidobacterium</i> türü	Diğer türler
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ^a	<i>B. longum</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i> ^a
<i>L. gasseri</i>	<i>B. animalis</i>	<i>S. cremoris</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>S. diacetylactis</i>
<i>L. paracasei</i>	<i>B. essensis</i>	<i>S. intermedius</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>B. laterosporus</i>	<i>S. salivarius</i>
<i>L. reuteri</i>		<i>Enterococcus faecium</i> ^b
<i>L. rhamnosus</i>		<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. helveticus</i>		<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>
<i>L. lactis</i>		<i>P. jensenii</i>
<i>L. sporogenes</i>		<i>Pediococcus</i>
		<i>Leuconostoc lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
		<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
		<i>Bacillus cereus</i>
		<i>Clostridium butyricum</i>

^a Gastrointestinal geçiş sırasında zayıf sağkalım nedeniyle probiyotik aktiviteleri hakkında hala tartışma vardır; ^b Potansiyel patojenite ve vankomisin direnci nedeniyle güvenlik kaygıları söz konusudur.

Fonksiyonel gıda pazarında, en sık kullanılanlar *Lactobacillus* spp. ve *Bifidobacterium* spp. suşlarıdır (Tablo 2.2).

Tablo 2.2: Ticari ürünlerde kullanılan probiyotik bakteri suşları (Yeung ve diğ., 1999; Mercenier ve diğ., 2003; Prado ve diğ., 2008; Vasiljevic ve Shah, 2008; Figueroa-González ve diğ., 2011).

Suşlar	Menşei/Üretici
<i>L. acidophilus</i>	NCFM Nestle, Switzerland
<i>L. johnsonii</i> LA1 (NCC 533)	Nestlé (Lausanne, Switzerland)
<i>L. acidophilus</i> 145	Danlac, Canada
<i>L. fermentum</i> RC-14	Urex Biotech (London, Ontario, Canada)
<i>L. rhamnosus</i> GR-1	Urex Biotech (London, Ontario, Canada)
<i>L. acidophilus</i> NCFM	Danisco, France
<i>B. lactis</i> HN019	Danisco, France
<i>B. animalis</i> DN-173 010	Danone (Paris, France)
<i>L. casei</i> DN-114 001	Danone (Paris, France)
<i>L. casei</i> CRL-431	Chr. Hansen, USA
<i>L. acidophilus</i> LA-1 (same as strain LA-5 sold in Europe)	Chr. Hansen, Inc. (Milwaukee, Wis.), USA
<i>L. paracasei</i> CRL431	Chr. Hansen, Inc. (Milwaukee, Wis.), USA
<i>B. animalis</i> spp. <i>lactis</i> Bb12	Chr. Hansen, Inc. (Milwaukee, Wis.), USA
<i>L. acidophilus</i> DDS-1	Nebraska Cultures, Inc. (Lincoln, Neb.)
<i>L. reuteri</i> SD2112 (same as MM2)	Biogaia (Raleigh, N.C.)
<i>L. casei</i> Shirota	Yakult (Tokyo, Japan)
<i>B. breve</i> strain Yakult	Yakult (Tokyo, Japan)
<i>B. longum</i> BB536 ^a	Morinaga Milk Industry Co., Ltd. (Zama-City, Japan)
<i>L. acidophilus</i> SBT-2062 ^a	Snow Brand Milk Products Co., Ltd. (Tokyo, Japan)
<i>B. longum</i> BB536	Snow Brand Milk Products Co., Ltd. (Tokyo, Japan)
<i>B. longum</i> SBT-2928 ^a	Snow Brand Milk Products Co., Ltd. (Tokyo, Japan)
<i>L. reuteri</i> MM53	BioGaia, Sweden
<i>L. plantarum</i> 299V	Probi AB (Lund, Sweden)
<i>L. rhamnosus</i> 271	Probi AB (Lund, Sweden)
<i>L. rhamnosus</i> LB21	Essum AB (Umeå, Sweden)
<i>Lactococcus lactis</i> L1A	Essum AB (Umeå, Sweden)
<i>L. salivarius</i> UCC118	University College (Cork, Ireland)
<i>L. rhamnosus</i> GG ^a	Valio Dairy (Helsinki, Finland)
<i>L. casei</i> F19	Arla Food, Denmark

^a Suşlar, Japonya'da Belirlenmiş Sağlık Kullanımına Yönelik Gıdalar (FOSHU) durumu verilmiştir

2.2.3. İnsanlarda Probiyotiklerin Kullanımı ve Güvenliği

Bugüne kadar edinilen bilgiler, probiyotik bakteriler arasında laktobasillerin insanlar için risk oluşturmada en yaygın kullanıma sahip olduğunu göstermektedir (Saxelin ve diğ., 1996; Naidu ve diğ., 1999). *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* veya *Lactococcus* cinsi probiyotiklerin patojenik veya virülans özellikleri bulunmadığı belirtilmekle beraber (Aguirre ve Collins, 1993), Gıda ve Tarım Örgütü/Dünya Sağlık Örgütü (2001) uzman konsültasyonu, belirli koşullar altında bazı *Lactobacillus* suşlarının ender görülen bakteriyemi vakaları gibi olumsuz etkilerle ilişkili olduğunu belirtmiştir (Saxelin ve diğ., 1996). Bununla birlikte, Finlandiya’da yürütülen sistematik epidemiyolojik bir çalışmanın verilerine göre, probiyotik laktobasillerin kullanımının artışıyla ilişkili bakteriyemi vakalarında artışın söz konusu olmadığı belirtilmiştir (Salminen ve diğ., 2001).

Diğer yandan, *Enterococcus* spp. gibi bazı laktik asit bakterilerinin virülans özelliklerine sahip olabileceği, bu nedenle enterokokların probiyotik olarak insanlar tarafından kullanılmaması da önerilmektedir (FAO / WHO, 2001).

Probiyotik gıda ürünlerinin tıbbi etkinliği, birey tarafından tüketilen ürünün mililitre veya gramındaki aktif/canlı hücre sayısına bağlıdır (Korbekandi ve diğ., 2011). Tüketicinin probiyotik gıda ürünlerine olan güvenini korumak için, üretim sırasında ve ürünün raf ömrü süresinde probiyotiklerin yüksek oranda hayatta kalma oranının korunması sağlanmalıdır (Cruz ve diğ., 2010).

Probiyotik gıda ürünlerinde ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından önerilen minimum probiyotik mikroorganizma sayısı 10^6 kob/ml’dir ve bu ürünlerin son tüketim tarihinde de bu sayıyı karşılaması beklenmektedir (Boylston ve diğ., 2004). Buna göre, tüketiciye faydalı etki için minimum probiyotik hücre dozu günde 10^8 - 10^9 mikroorganizma olarak kabul edilir. Bu da mililitre veya gramında 10^6 - 10^7 canlı hücre içeren 100 g ürün tüketilmesine tekabül eder (Knorr, 1998; Lourens-Hattingh ve Viljoen, 2001a; Karimi ve diğ., 2011).

Probiyotik organizmalar faydalı sağlık etkilerini, besinler için rekabet, adezyon ve organik asitler, hidrojen peroksit, bakteriyosinler gibi farklı antimikrobiyal metabolitlerin sentezi gibi mekanizmalardan biri veya birkaçının kombinasyonu ile antimikrobiyal etki olarak sergileyebilirler (Pithva ve diğ., 2011).

2.2.4. Probiyotik Mikroorganizmaların Özellikleri ve Seçilme Kriterleri

Bilinen ve araştırılmaya devam edilen yararlı etkileri nedeniyle ilgi çeken mikroorganizmaların probiyotik olarak kabul edilebilmesi ve probiyotik endüstrisinde kullanılabilmesi için bazı kriterleri sağlaması gereklidir.

Probiyotik suşun en önemli özelliklerinden biri, genel olarak güvenli görülmesi [“generally regarded as safe” (GRAS)] ve insan sağlığı üzerinde yararlı etkiler yaratmasıdır. İdeal bir probiyotik suşu özellikle insan kullanımına yönelik ise, insan kaynaklı olmalı ve prebiyotikleri fermente edebilmelidir. Konakçı organizmada patojenik, toksik, mutajenik ve kanserojenik olmamalıdır. İnsan bağırsak epitel hücrelerine bağlanarak kolonize olabilmeli ve enflamatuvar etkileri olmadan immün uyarımı destekleyebilmelidir. Mide ve ince bağırsaktan geçişte yeterli sayıda hayatta kalabilmesi için, asidik ve alkali koşullara, bağırsakta bulunan lizozim gibi enzimlere ve sindirim sırasında üretilen toksik metabolitlere karşı dayanıklı olması gerekmektedir (Saarela ve diğ., 2000; Homayouni ve diğ., 2008). İyi üreme özelliklerine sahip olmalı, bakteriyosinler gibi antimikrobiyal maddeleri üretmeli ve patojenlere karşı antagonistik olmalıdır. Özellikle antibiyotik direnci bakımından, plazmid transfer mekanizması olmadan genetik olarak stabil olmalıdır. Ayrıca, probiyotikler işleme ve depolama sırasındaki yaşama kabiliyetinin sürdürülmesi, ürünlerde uygulama kolaylığı ve gıdanın fizikokimyasal işleme koşullarına direnç gibi diğer istenen özellikleri de sunmalıdır (Prado ve diğ., 2008).

2.2.5. Probiyotiklerin Etki Mekanizmaları

2.2.5.1. Bağırsaklara Tutunma ve Kolonizasyon

Lactobacillus casei GG, *L. acidophilus*, *L. plantarum* ve bazı *Bifidobacterium* türleri dahil olmak üzere bazı probiyotiklerin insan hücre hatlarına kuvvetle tutunabildikleri gösterilmiştir (Romond ve diğ., 1997).

2.2.5.2. Besinler için Rekabet ve Antimikrobiyal Maddelerin Üretimi

Probiyotik suşlar, fermentasyon için gerekli olan aynı zamanda ortamda sınırlı miktarda bulunan besinler için rekabet ederek patojenik organizmaları daha fazla inhibe eder. Ayrıca organik asitler, hidrojen peroksit, bakteriyosinler gibi antimikrobiyal metabolitleri salgırlar. Örneğin, laktik asit bakterileri laktik asit ve diğer organik asitleri üretir, böylece ortamın pH'sını

düşürür ve sonuç olarak bakteriyel patojenlerin üremesini inhibe eder (Saarela ve diğ., 2000; Sharma ve Saharan, 2014).

2.2.5.3. Mukozal ve Sistemik Konakçı Bağışıklığının Uyarılması

Hayvan çalışmalarından, probiyotik organizmaların mukozal ve sistemik bağışıklık sistemini modüle edebildiğine dair önemli kanıtlar elde edilmiştir. Konakçı bağışıklığının uyarılmasında, mikroorganizmaların bağırsak hücrelerine yapışması ve bağırsakla ilişkili lenfoid doku ile etkileşime girme yeteneğinin etkili olduğu düşünülmektedir (Galdeano ve Perdigon, 2006). Ek olarak probiyotiklerin, pro-karsinogenlerin seviyelerini arttırabilen belirli bakteriyel enzimlerin aktivitesini yok ederek hayvanlarda kolon kanseri riskini azalttığı da belirtilmektedir (de Vrese ve Schrezenmeir, 2008).

2.2.6. Probiyotikler Tarafından Üretilen Antimikrobiyal Bileşikler

Probiyotik suşlar aynı nişi paylaşan diğer mikroorganizmalara doğal bir rakip olarak organik asitler, etanol, hidrojen peroksit, birkaç enzim ve bakteriyosin gibi çeşitli antimikrobiyal bileşikler üretme kabiliyetine sahiptir (De Vuyst ve Leroy, 2007; Vasiljevic ve Shah, 2008). Bunlar arasında 3 ana bileşiğin dikkate alınması gerekmektedir:

1. Organik asitler: LAB tarafından üretilen laktik, asetik ve propiyonik asitler ortamın pH değerini düşürerek, patojenik ve/veya bozulmaya neden olan mikroorganizmaların gelişimini engeller (Caplice ve Fitzgerald, 1999). Probiyotikler tarafından üretilen organik asitlerin genellikle, hücre zarı fonksiyonunu engelleme, aktif transportu inhibe etme, hücre içi pH'yı düşürme ve çeşitli metabolik fonksiyonları inhibe etme ile antimikrobiyal etkileri gösterdikleri düşünülmektedir (Ross ve diğ., 2002). Bu bileşikler farklı etki mekanizmalarına sahip olduğundan, hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterileri, ayrıca maya ve küfleri inhibe etmektedir (Caplice ve Fitzgerald, 1999).

2. Hidrojen peroksit: *Lactobacillus* türleri tarafından üretilen hidrojen peroksitin normal vajinal floranın spesifik olmayan antimikrobiyal savunma mekanizması olabileceği düşünülmektedir (Reid ve Burton, 2002). Hidrojen peroksit hem Gram pozitif hem de Gram negatif organizmaları inhibe eder (Pithva ve diğ., 2011).

3. Bakteriyosinler: Son zamanlarda yapılan yayınlar, bazı bağırsak laktobasili ve bifidobakterilerin bakteriyosin adı verilen bakteriyel patojenlere karşı aktif maddeler ürettiklerini ortaya koymuştur (De Vuyst ve Leroy, 2007; Pithva ve diğ., 2011; Yang ve diğ., 2014). Bakteriyosinler, yakından ilişkili türlere karşı antimikrobiyal aktivite gösteren ribozomal olarak sentezlenmiş peptitler olup, biyolojik olarak aktif proteinler veya protein kompleksleri olarak tanımlanır ve farklı bakteri grupları tarafından üretilmektedir (Reis ve diğ., 2012). Bununla birlikte, nisin gibi laktik asit bakterileri tarafından üretilen bazı bakteriyosinlerin, sadece yakından ilişkili türleri değil aynı zamanda gıda kaynaklı patojenlere karşı da etkili olduğu bilinmektedir (Tagg ve Dajani, 1976).

“Bakteriyosin” terimi, ilk kez 1953'te *Escherichia coli*'den elde edilen kolisin tipi protein antibiyotiklerini tanımlamak için kullanılmıştır (Jacob ve Lwoff, 1953). Ayrıca, Tagg 1991 yılında *E. coli* tarafından üretilen kolisinleri Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen antimikrobiyal proteinlerden ayırt edebilmek için “Bakteriyosin-benzeri inhibe edici maddeler (BLIS)” terimini de önermiştir. Ancak günümüzde, Gram pozitif veya Gram negatif kökenli olmasına bakılmaksızın farklı bakteri grupları tarafından üretilen çeşitli antimikrobiyal bileşikler tanımlamak için bakteriyosin terimi kullanılmaktadır (Tagg ve Dajani, 1976; Hechard ve Sahl, 2002).

Bakteriyosinlerin, *Pseudomonas* spp., *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Vibrio* spp., *Shigella* spp. ve *Aeromonas* spp. gibi Gram pozitif ve Gram negatif bakterileri inhibe edebildiği bilinmektedir (De Vuyst ve Leroy, 2007; Karpiński ve Szkaradkiewicz, 2013). Bakteriyosinler, duyarlı hücreler üzerinde bakterisidal veya bakteriyostatik etki gösterebilir. Etkinin sidal veya statik olması, bakteriyosinin dozu ve saflık derecesi, indikatör hücrelerin fizyolojik durumu (büyüme fazı) ve sıcaklık, pH, diğer antimikrobiyal bileşiklerin varlığı gibi çeşitli faktörlerden büyük ölçüde etkilenmektedir (Yang ve diğ., 2014).

Bakteriyosinlerin sekonder metabolitler olan konvansiyonel antibiyotiklere kıyasla en önemli avantajları, birincil metabolit olmaları ve nispeten basit biyosentez mekanizmalarına sahip olmalarıdır. Bu özellik, bakteriyosinlerin, hedef mikroorganizmalara karşı aktivitelerini veya özgüllüklerini arttırmak için biyomühendislik yoluyla kolayca uyum sağlayabilmelerini temin etmektedir (Perez ve diğ., 2014). Ayrıca, klasik antibiyotiklerle karşılaştırıldığında, genellikle güvenli maddeler (GRAS) olarak kabul edilir. Bakteriyosinler protein yapıda olduğundan

proteolitik enzimlerle degrade olup, aktivitesini yitirebilmektedir (De Vuyst ve Leroy, 2007; Perez ve diğ., 2014), bu sayede ökaryotik hücrelere karşı ne aktif ne de toksiktir, bu nedenle bağırsak mikrobiyotaları üzerinde çok az etkisi vardır.

Bakteriyosinlerin çoğu, membran geçirgenliğini bozarak veya esansiyel enzimlere etki ederek duyarlı bakterileri öldürür. Nisin bakteriyosini, hücre duvarı öncüsü olan lipit II ile bir kompleks oluşturularak hücre duvarı biyosentezini inhibe eder (Annou ve diğ., 2007). Ayrıca, bakteriyosinler genellikle ısıl dirençlidir bu sayede pastörizasyon ve sterilizasyondan sonra antimikrobiyal aktiviteleri sürebilir. Diğer yandan, bu proteinler birçok gıda kaynaklı patojenik ve bozulmaya neden olan bakteriye karşı nispeten geniş bir antimikrobiyal spektruma sahiptirler. Bu avantajları sayesinde, bakteriyosin üreten suşlar, fermente edilmiş gıdaların güvenlik ve kalitesini arttırmak için starter kültürlerinin bir parçası veya ilave olarak kullanılabilir. Son zamanlarda, düşük konsantrasyonlarda etkili oldukları ve gıdaya eklendiklerinde duyu kaliteyi değiştirmedikleri için, gıda endüstrisindeki kimyasal koruyucuların yerini almaya başlamışlardır (Zacharof ve diğ., 2013). Örneğin, *Lactococcus lactis* tarafından üretilen nisin, koruyucu olarak kullanılan güvenli bakteriyosinlerdendir (Fawzya, 2010).

2.3. TÜRKİYE'YE ÖZGÜ FERMENTE PROBİYOTİK İÇECEKLER

Türkiye'nin farklı bölgelerinde üretilen çeşitli geleneksel fermente gıdalar ve içecekler bulunmaktadır. Şalgam suyu, hardaliye, boza, ayran ve kefir en çok bilinen geleneksel Türk fermente alkolsüz içecekleridir. Şalgam suyu ve hardaliye sebze, meyvelerden, ayran süt veya yoğurttan laktik asit fermentasyonu ile üretilirken; boza ve kefir ise hem alkol hem de laktik asit fermentasyonu ile sırasıyla tahıllardan ve süttten üretilir (Altay ve diğ., 2013).

2.3.1. Çalışmada Kullanılan Türk Fermente İçecekleri

Tablo 2.3'te çalışmada kullanılan fermente içeceklerin besin değerleri, ham maddeler, ürün özellikleri ve mikrobiyota ve/veya probiyotik kompozisyonu gösterilmektedir.

Tablo 2.3: Fermente geleneksel Türk probiyotik içeceklerinin özeti (Baschali ve diğ., 2017)

İçecek	Besin bilgileri	Duyusal özellikleri	Substrat	Probiyotik/Mikrobiyota Kompozisyonu	Kaynaklar
Kefir	Her 100 g: yağ 1.5g, protein 3.0–3.4g ve laktoz 2.0–3.5g, laktik asit 0.6–1.0ml/100ml, vitaminler: B1, B12, B6, K, askorbik, folik asit, amino asitler, Mg, Ca, P	Efervesan süt, Ekşi, hafif asidik ve alkollü, viskoz, kendinden karbonatlı, elastik kıvam ve düzgün kremalı. Algılanabilir maya aroması, tart tadı, beyaz renkli, hafif köpüklü üst.	Her türlü süt (inek, keçi, deve, koyun ve bufalo) sütü; soya sütü, hindistan cevizi ve pirinç sütü	<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. kefir</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. caucasicus</i> , <i>Strep. thermophilus</i> , <i>S. durans</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>L. cremoris</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> K. <i>lactis</i> , <i>Candida inconspicua</i> , <i>C. kefir</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Cryptococcus humicolus</i>	Marsh ve diğ., 2014; Guzel-Seydim ve diğ., 2010; Kesmen ve Kacmaz, 2011; Yüksekdağ ve diğ., 2004; Kabak ve Dobson, 2011; Özdeştan ve Üren, 2010; Altay ve diğ., 2013
Ayran	Yağ (% 0.1–3), protein (%1.44–3.48), tuz (% 0.17–1.75), yüksek vitamin içeriği ve Ca	Düşük viskoziteli ve alkolsüz	İnek sütü veya yogurt	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>	Altay ve diğ., 2013; Marsh ve diğ., 2014; Kocak ve Avsar, 2009; Kabak ve Dobson, 2011
Boza	Laktik asit, karbonhidrat, protein, vitaminler ve piridoksin, riboflavin, tiamin ve nikotinamid	Kolloid süspansiyon u, Viskoz sıvı, hafif tatlı veya ekşi tat, soluk sarı, asidik ve alkollü koku	Darı unu, mısır, çavdar, yulaf ve arpa unu veya Buğday ve pirinç irmik	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. coprophilus</i> , <i>Lactococcus</i> sp., <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Leuconostoc reffinolactis</i> , <i>Pediococcus</i> sp., <i>Sacch. cerevisiae</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Geotrichum penicillatum</i>	Blandino ve diğ., 2003; Gotcheva ve diğ., 2000; Kabak ve Dobson, 2011; Marsh ve diğ., 2014; Arici ve Daglioglu, 2002; Altay ve diğ., 2013; Prado ve diğ., 2008; Todorov ve diğ., 2008
Hardaliye	Antioksidanlar, fenolik içeriği, Sinigrin (hardal tohumlarından)	Asidik, alkolsüz, üzümün orijinal rengi	Kırmızı üzüm suyu ve posası	<i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. acetotolerans</i> , <i>L. casei</i> ssp. <i>Pseudopantarum</i> ; <i>L. pontis</i> , <i>L. sanfranciscensis</i>	Arici ve Coskun, 2001; Kabak ve Dobson, 2011; Coskun ve Arici, 2006; Aydogdu ve diğ., 2014; Prado ve diğ., 2008
Şalgam	Vitaminler (A, C ve B), mineraller (Ca, K ve Fe), amino asit ve polifenol içeriği	Kırmızı renkli, bulutlu, ekşi ve alkolsüz	Siyah (mor) havuç (<i>Daucus carota</i>), turp (<i>Brassica rapa</i>)	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. brevis</i> ; <i>L. paracasei</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>L. mesenteroides</i> ssp. <i>Mesenteroides</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , Mayalar	İncedayi ve diğ., 2008; Tangüler ve Erten, 2012; b; Arici, 2004; Erten ve diğ., 2008

2.3.1.1. Boza

Boza, buğday, darı, çavdar, pirinç irmiği veya ununun şeker veya sakarinle karıştırılmasıyla maya ve laktik asit fermentasyonu ile üretilen geleneksel fermente edilmiş alkolsüz bir Türk içeceğidir. Soluk sarı renkte ve hafif ekşi viskoz bir sıvıdır. Bulgaristan, Arnavutluk, Türkiye, Romanya ve Balkan Yarımadası'ndaki diğer bazı ülkelerde de hoş tadı, lezzeti ve besleyici özellikleri nedeniyle yaygın olarak tüketilmektedir (Gotcheva ve diğ., 2001; Arici ve Daglioglu, 2002; Akpınar-Bayizit ve diğ., 2010; Yegin ve Fernandez-Lahore, 2012).

Boza üretiminde, LAB ile laktik asit fermentasyonu ve mayalar tarafından alkolik fermentasyon olmak üzere iki fermentasyon türü meydana gelmektedir. LAB, laktik asitler gibi antimikrobiyal metabolitler üreterek asitliği artırıp koruyucu etki sağlamaktadır. Öte yandan mayaların alkol fermentasyonundan kaynaklanan metabolitler, bozanın tat ve kokusunu oluşturmaktadır (Arici ve Daglioglu, 2002; Kabak ve Dobson, 2011; Yegin ve Fernandez-Lahore, 2012).

2.3.1.2. Kefir

Türkçe “Keyif” kelimesinden türetilmiş olan kefir, Asya'nın Kafkasya bölgesinden ve Balkanlardan köken alan hafifçe asidik ve alkollü fermente edilmiş bir içecektir. (Tamime, 2006; Otles ve Cagindi, 2003; Tamime, 2006). Aslında, kefir 21. yüzyılın yoğurdu olarak tanımlanmıştır (Gorski, 1994; Lopitz-Otsoa ve diğ., 2006, Tamime, 2006; Leite ve diğ., 2013).

Kefir inek, koyun, keçi veya diğer süt türlerinin fermentasyonu ile üretilir (Kabak ve Dobson, 2011). Geleneksel olarak süte polisakkarit matrisindeki bakteri ve maya konsorsiyumu olan kefir taneleri eklenerek üretilmektedir (Simova ve diğ., 2002; Lopitz-Otsoa ve diğ., 2006).

Kefirin mikrobiyolojik kalitesi ve fizikokimyasal özellikleri, kullanılan kefir kültürünün mikrobiyal özellikleri, kültürün süt oranı, inkübasyon sıcaklığı ve süresi, saklama sıcaklığı ve sanitasyon koşullarından etkilenmektedir (Güzel-Seydim ve diğ., 2010). İçindeki bifidobakteriler ve LAB tarafından üretilen laktik asit, bakteriyosinler, hidrojen peroksit, asetaldehit, uçucu asitler, diasetil ve/veya karbondioksit sebebiyle kefirin antimikrobiyal aktivitesi gösterdiği rapor edilmiştir (Cetinkaya ve Elal-Muş, 2012).

2.3.1.3. Hardaliye

LAB florası nedeni ile probiyotik olarak tanımlanan hardaliye, Türkiye’de Kırklareli’ye ait üzüm esaslı fermente geleneksel alkolsüz bir içecektir (Prado ve diğ., 2008; Aydogdu ve diğ., 2014). Üzüm fenolik bileşikler ve antosiyaninler bakımından zengindir (Gil ve diğ., 2000). Hardaliyenin insan vücudu için yüksek antioksidan etkileri sağlayıp, oksidatif stresi önleyerek kanser hücrelerinin oluşumunu inhibe ettiği bildirilmektedir (Aktas ve diğ., 2015).

Bir bardak hardaliye, 39 g karbonhidrat içerip 170 kcal enerji vermektedir. Ayrıca, hardal yağlarının dolaşım bozuklukları, soğuk algınlığı ve bronşit üzerinde tedavi edici etkileri olduğu ve antimikrobiyal özelliğe sahip olduğu bildirilmektedir. Lezzetli tadı, tuzsuz, alkolsüz, az yağlı ve süt içermemesi gibi özellikleri nedeniyle, vejetaryenler, çocuklar, hipertansiyon hastaları, süt intoleransı ve yüksek kolesterol seviyesi olan kişiler tarafından tüketilmesinin uygun olduğu bildirilmektedir (Aktas ve diğ., 2015). Hardaliyenin besleyici değerine ek olarak sindirim sistemine ve koroner kalp hastalığını önlemeye yardımcı olduğu ifade edilmektedir (Prado ve diğ., 2008).

2.3.1.4. Ayran

Ayran, yoğurda su ilavesiyle evde yapılmış veya pastörize edilmiş ve standardize edilmiş süte *Streptococcus thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* eklenmesiyle endüstriyel olarak üretilen süt ürünüdür (TFC, 2009). Ayran, özellikle yaz mevsiminde Türkiye’de yaygın olarak tüketilmektedir (Kabak ve Dobson, 2011).

Prebiyotik olarak inulin, probiyotik suşları olarak *Bifidobacterium* spp ve *L. acidophilus*’un eklenmesiyle, ayranın fonksiyonel ve probiyotik özelliklerinin geliştirilmesi mümkündür (Kök-Taş ve Güzel-Seydim 2010).

2.3.1.5. Şalgam Suyu

Şalgam suyu siyah havuç, bulgur unu, tuz ve su karışımının laktik asit fermentasyonu ile üretilir (Canbaş ve Deryaoğlu, 1993). Türkiye’nin Akdeniz Bölgesi illeri başta olmak üzere tüm ülkede yaygın olarak tüketilmektedir (Tangüler ve Erten, 2012). Şalgam suyu, mineralli, amino asit, antosiyaninler, polifenol ve vitamin içeriği nedeniyle yüksek derecede besleyici bir içecektir

(Kammerer ve diğ., 2004; Incedayi ve diğ., 2008; Erten ve diğ., 2008, Yılmaz-Ersan ve Turan, 2012).

Birkaç çalışmada, geleneksel Türk içeceklerinin mikrobiyota bileşimi ve bunların probiyotik özellikleri rapor edilmekle beraber, geleneksel Türk içeceklerinin antimikrobiyal etkileri konusunda bütünsel bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla, çalışmamızda bazı Türk probiyotik içeceklerinin mikrobiyal kompozisyonunu incelemek ve daha önemlisi, bu ürünlerden izole edilen probiyotik suşların bazı standart insan patojenleri üzerine antimikrobiyal aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır.



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. İÇECEKLERDEN PROBİYOTİK MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU

Ticari olarak edinilen Türk probiyotik içecek örneklerinin (boza, kefir, şalgam, ayran, hardaliye) steril % 0.5 peptonlu su kullanılarak 10^{-6} 'ya kadar on kat seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Hedef mikroorganizmaları izole etmek için seyreltilmiş örneklerden 100 µl alınarak uygun besiyerine yayma ekim yapılmıştır.

Lactobacillus bakterilerinin izolasyonu için deMan Rogosa ve Sharpe (MRS; Merck, Germany) agar içeren Petri kaplarına, Bifidobakterilerin izolasyonu için *Bifidobacterium* Selective Medium (BSM; Sigma-Aldrich) içeren Petri kaplarına ekim yapılmıştır. Petri kapları 37 °C'de GasPak içeren anaerobik kavanozlarda 72 saat süresince inkübe edilmiştir.

Laktik streptokoklar ve *Streptococcus thermophilus* cinsi bakterilerin izolasyonu için, örnekler M17 agar (Merck, Germany) besiyerine ekilip 72 saat 37 °C'de aerobik olarak inkübe edilmiştir.

Mayaların izolasyonu için 0.05 g/l kloramfenikol ilave edilmiş Sabouraud % 4 Dextrose Agar (SDA; Merck, Germany) besiyerine ekim yapılan örnekler 3-5 gün boyunca 28 °C'de aerobik inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süreci tamamlanan Petri kaplarından, morfolojik olarak birbirinden farklı olan koloniler seçilerek azaltma yöntemi ile yeni besiyerlerine aktararak saflaştırılmış ve antimikrobiyal etkinlik testleri için saklanmıştır.

3.2. PROBİYOTİK İZOLATLARIN SAKLANMASI

Morfolojik olarak karakterize edilen saf izolatlar, antimikrobiyal analizlere kadar -20 ve -86 °C'de % 20 gliserol içeren uygun broth besiyerlerinde saklanmıştır. Laktobasiller, laktik streptokoklar, bifidobakteri ve maya izolatları için sırasıyla MRS, M17, BSM ve YEPG broth besiyerleri kullanılmıştır.

Sonraki tüm analizler için, izolatlar uygun inkübasyon koşulları ve besiyeri ortamında iki kez pasajlanıp aktive edilmiştir.

3.3. PROBİYOTİK SUŞLARIN İDENTİFİKASYON VE KARAKTERİZASYONU

3.3.1. Morfolojik Karakterizasyon

İlk olarak saflaştırılan izolatların morfolojik özellikleri Gram boyama ve katalaz testleri ile belirlenmiştir.

3.3.1.1. Gram Boyama

İzolatların Gram boyanma özelliklerinin tespiti için katı besiyerinde 18-24 saat inkübe olmuş kolonilerden öze yardımıyla bir toplu iğne başı büyüklüğünde alınıp, aseptik şartlarda fizyolojik tuzlu su damlatılmış lam üzerinde süspanse edilerek lam yüzeyine yayılmıştır. Lam önce havada kurutulup sonra bek alevinden 3 kez geçirilerek tespit edilmiştir. Daha sonra preparatın üzerine kristal viyole boyası damlatılıp 2 dakika beklenmiş ve su ile yıkanarak kristal viyole uzaklaştırılmıştır. Preparatın üzerine lugol çözeltisi damlatılarak 1 dakika bekletilip, su ile yıkanarak lugol çözeltisi uzaklaştırılmıştır. Ardından % 95'lik etil alkol çözeltisi damlatılarak renksizleştirme işlemi yapılmıştır. Su ile yıkanan preparata zıt boya olarak sulu fuksin damlatılıp 1 dakika bekletildikten sonra tekrar su ile yıkanmış, havada kendi halinde kurumaya bırakılmıştır. Boyanmış preparata immersiyon yağı damlatılıp x100 büyütmeli objektif ile ışık mikroskopunda (Nikon) incelenmiştir.

3.3.1.2. Katalaz Testi

MRS, BSM ve MI7 agar besiyerinde 18-24 saat inkübe edilmiş bakteri kolonilerinden alınarak lam üzerine yayılmış ve üzerine % 3 hidrojen peroksit damlatılmıştır. 10-15 saniye içerisinde gaz kabarcıklarının oluşması pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Mor olarak boyanan Gram pozitif ve katalaz özelliği bakımından negatif reaksiyon veren bakteriler daha sonraki tanımlama aşamaları için çalışmaya dahil edilmiştir.

3.3.2. Genotipik Teknik ile İzolatların Tanımlanması

Morfolojik olarak karakterize edilen bakteri izolatları Bakteriyel Yapay Kromozom (BAC) DNA'dan veri dizileme (data sequencing) ile tanımlanmıştır. BAC DNA için, BigDye® Terminator Cycle dizileme kiti kullanılarak modifiye edilmiş dizileme protokolü uygulanmıştır.

3.3.2.1. Büyük Kalıplar için Optimize Edilmiş Dizileme Reaksiyonu

- **BAC DNA Saflaştırılması:** 1 gece süresince inkübe edilmiş bakteriyel kültürlerden (2 ml) modifiye edilmiş bir alkalın lizis prosedürü ve anyon değiştirme reçinesi kullanılarak DNA saflaştırılmıştır. Çalışmanın sonraki aşamalarında 3-5 µg kalıp kullanılmıştır.
- **Döngü Dizilemesi:** BAC DNA, BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti kullanılarak dizilenmiştir. Protokol, büyük DNA kalıpları için optimize edilmiş termal döngü koşullarını içerecek şekilde modifiye edilmiştir (Panel A). ‘Applied Biosystems 3730 DNA’ analizöründe kılcal elektroforez ile analizden önce reaksiyonun temizlenmesi için Sephadex bazlı bir pürifikasyon metodu kullanılmıştır (Panel B). Plazmid kalıpları kontroller olarak paralel olarak analiz edilmiştir (Applied Biosystems, 2008).

Modifiye edilmiş Protokolü

Panel A: Cycle Sequencing Protokolü

Reaksiyon (10 µL Reaksiyon hacmi)	
DNA kalıpı	3–5 µg BAC DNA
Primer	10–15 pmol
BigDyeR Terminator Ready Reaction Mix	1.0 µL
5X Sequencing Buffer	1.5 µL
Döngü koşulları:	
Denatürasyon	5 dk, 95 °C 50 döngü:
Denatürasyon	30 dk, 95 °C
Bağlanma	10 san., 52 °C
Uzama	4 dk., 60 °C
Thermal Cycler	96-Well GeneAmp® PCR System 9700

Panel B: Reaksiyon Temizlenmesi

	Sephadex G-50 Column MultiScreen HTS Filter Plates	BigDye® XTerminator™ Purification Kit
Protokol	Santrifüj 5 dk, 910 x g	45 µL SAM Solution ekle 10 µL BigDye XTerminator solution ekle Vortex 1800 rpm, 30 dk, oda sıcaklığında Santrifüj 2 dk, 13,000 x g
Kılcal Elektroforez	Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer	
	48 capillaries	
	36 cm capillary array length	
	POP-7 polymer	
	Standard Sequence module with 8 sec injection time and 1 kV voltage	
	Sequence Analysis Software with KB™ Basecaller	

İzolatların dizi analizinde üniversal 16S rRNA (forward: 5'-TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; reverse: 5'-TACCGCGGCTGCTGGCAC3' primerleri kullanılmıştır.

3.4. İZOLATLARIN ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRMESİ

Probiyotik izolatların direkt olarak ve süpernatantları hazırlanarak iki farklı şekilde, antimikrobiyal aktivite testleri yürütülmüştür.

3.4.1. Probiyotik İzolatların Süpernatantın Hazırlanması

Probiyotik izolatlar 24 saat inkübe edilerek aktiveleştirilmiş ve uygun broth besiyeri içeren 10 ml'lik santrifüj tüplerine ekimler yapıp iki kez alt kültürleri alınmıştır. Alt kültürü tamamlanan örnekler 4 °C'de 8000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüştür. Elde edilen üst faz 0. 22 µm por çaplı (AISIMO®) enjektör ucu filtreden geçirilerek steril edilmiş ve agar oluk difüzyon yönteminde kullanılmıştır.

3.4.2. Antimikrobiyal Etkinlik Değerlendirmesinde Kullanılan Mikroorganizmalar

Probiyotik izolatların antimikrobiyal aktiviteleri, Tablo 3.1’de gösterilen yaygın standart insan mikrobiyal patojenlerine (bakteriler ve maya) karşı değerlendirilmiştir. Tüm patojenler antimikrobiyal aktivite testlerinden 24 saat önce Trypticase Soy Agar (TSA; Oxoid) üzerinde aktifleştirilmiştir.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan indikatör suşlar

Antimikrobiyal Aktivite Testinde Kullanılan Suşlar	Suş kodu
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 4352
<i>Metisilin dirençli Staphylococcus aureus (MRSA)</i>	ATCC 33591
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 14028
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 1228
<i>Vankomisin dirençli Enterococcus faecium (VRE)</i>	ATCC 51299
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231

3.4.3. Nokta Damlatma Yöntemi

Probiyotik izolatların seçilmiş insan patojenleri üzerine antimikrobiyal etkisi öncelikle nokta damlatma yöntemi ile belirlenmiştir. İzolatlar uygun sıvı besiyerinde 24 saat iki kez üretilmişlerdir. Daha sonra 24 saatlik aktif sıvı kültürden 2 µl alınıp besiyeri yüzeyine nokta damlatma şeklinde inoküle edilmiştir. Anaerobik izolatlar anaerop koşullarda; aerobik izolatlar aerobik koşullarda 37 °C’de 18-24 saat süre inkübasyona bırakılarak nokta koloni oluşumu

sağlanmıştır. Standart test mikroorganizmalarının 18-24 saatlik kültürlerinden McFarland 0.5 ($1-1.5 \times 10^8$ kob/ml (koloni oluşturan birim)/ml) bulanıklık standardına eşdeğer süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyonlardan 100 µl alınarak 10 ml yumuşak agar içeren TSA (% 0.75 agar) tüplerine aktarılıp vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışım üremiş probiyotik izolatların spot kolonileri üzerine ikinci bir tabaka olarak dökülmüş ve katılaşması için oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Bakterileri içeren Petri kapları 37 °C'de 24 saat aerobik koşullarda, *Candida albicans* kültürlerini içeren Petri kapları 28 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda nokta ekim yapılmış izolatların etrafındaki oluşan üreme inhibisyon zonlarının çapları mm olarak ölçülüp kaydedilmiştir. Tüm deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir (Tour'e ve diğ., 2003).

Yirmi veya 20 mm üstünde (≥ 20 mm çaplı) olan İnhibisyon zonları, $\geq 10 \leq 20$ mm arasında ve 10 mm'den az (< 10 mm) zonlar sırasıyla güçlü/yüksek, orta ve düşük inhibisyonlar olarak kabul edilip kaydedilmiştir.

3.4.4. Agar Kuyu Difüzyon Yöntemi

Probiyotik bakteriler tarafından bakteriyosin üretimi belirlemek ve standart test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitesini tespit etmek üzere, agar oluk difüzyon yöntemi uygulanmıştır. Probiyotik bakteri süpernatantları hazırlanarak, 0.22 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril edilmiştir. İzolatların antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirilmesinde hedef organizma olarak seçilmiş standart bakteri ve *Candida albicans* maya kültürleri McFarland 0.5 ($1-1.5 \times 10^8$ kob/ml) bulanıklık standardına eşdeğer hazırlanmış, 40-45 °C'ye soğutulmuş olan 20 ml steril Mueller Hinton Agar (MHA) besiyerine 100 µl eklenmiştir. Vortekslenerek homojen hale getirilen test organizması-agar karışımı 90 mm çapındaki steril Petri kaplarına 4 ± 0.5 mm kalınlığında dökülmüştür. Petri kabında katılaşan agarlar üzerinde 2.5 cm aralıklarla steril delgeç ile 6 mm çaplı kuyucuklar açılmıştır. Açılan her kuyuya süpernatanttan ve kontrollerden 50 µl konulmuştur. Tüm bakteri örnekleri 37 °C'de, *Candida albicans* 28 °C'de aerobik koşullarda 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından üreme inhibisyon zonlarının varlığı ve büyüklüğü incelenmiştir. Kuyucukların etrafındaki zonlar bir cetvel yardımıyla mm cinsinden ölçülmüştür. Tüm deneyler 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Negatif kontrol olarak steril sıvı besiyeri (MRS broth) kullanılmıştır (Ripamonti ve diğ., 2011).

3.5. DENEYLERDE KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASALLAR

3.5.1. Kullanılan Besiyerleri

3.5.1.1. *de Man Rogosa Sharpe (MRS Agar)*

Enzimatik olarak sindilirmiş kazein	10 g/L
Et Özütü	10 g/L
Maya Özütü	4 g/L
D(+)-Glukoz	20 g/L
Dipotasyum Hidrojen Fosfat	2 g/L
Tween® 80	1.08 g/L
Di-Amonyum Hidrojen Sitrat	2 g/L
Sodyum Asetat	5 g/L
Magnezyum Sülfat Heptahidrat	0.2 g/L
Manganeze Sülfat Monohidrat	0.04 g/L
Agar-Agar	14 g/L
Distile su	1000 ml

3.5.1.2. *Bifidus Selective Medium (BSM Agar; Sigma-Aldrich)*

Pepton ve et özütü	
Maya Özütü	
Dekstros	
Sodyum klorid	
BSM-Agar	55.5 g

Distile su	1000 ml
------------	---------

3.5.1.3. M 17 Agar, TERZAGHI

Pepton (soymeal)	5.0 g/L
------------------	---------

Pepton (et)	2.5 g/L
-------------	---------

Pepton (kazein)	2.5 g/L
-----------------	---------

Maya Özütü	2.5 g/L
------------	---------

Et Özütü	5.0 g/L
----------	---------

Laktoz monohidrat	5.0 g/L
-------------------	---------

Askorbik asit	0.5 g/L
---------------	---------

Sodyum b-gliserofosfat	19.0 g/L
------------------------	----------

Magnezyum sülfat	0.25 g/L
------------------	----------

Agar-agar	12.75 g/L
-----------	-----------

Distile su	1000 ml
------------	---------

3.5.1.4. Trypton Soy Broth (Sigma-Aldrich/Merck)

Pankreatik olarak sindilirmiş kazein	17.0 g/L
--------------------------------------	----------

Enzimatik olarak sindilirmiş soya fasulye (papain sindirimi)	3.0 g
--	-------

Sodyum klorid	5.0 g
---------------	-------

Dipotasyum hidrojen fosfat	2.5 g
----------------------------	-------

Glukoz	2.5 g
--------	-------

Distile su	1000 ml
------------	---------

3.5.1.5. Tryptic Soy Agar

Agar	15 g/L
Kazein pepton (pankreatik)	15 g/L
Sodyum klorid	5 g/L
Soya pepton (papainic)	5 g/L
Distile su	1000 ml

3.5.1.6. Sabouraud 4% Dextrose Agar (Merck)

Pepton (kazein)	5.0 g/L
Pepton (et)	5.0 g/L
D (+) Glukoz	40.0 g/L
Agar-agar	15.0 g/L
Distile su	1000 ml

3.5.1.7. Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD Broth; Himedia)

Peptik olarak sindilirmiş hayvan dokusu	20.0 g/L
Maya Özütü	10.0 g/L
Dekstroz	20.0 g/L
Distile su	1000 ml

3.5.1.8. Mueller Hinton Agar (MHA)

Et Özütü	2.00 g/L
Acit Hydrolysate (kazein)	17.50 g/L
Nişasta	1.50 g/L

Agar	17.00 g/L
Distile su	1000 ml

Tüm besiyerleri 121 °C’de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

3.5.2. Kullanılan Kimyasallar

3.5.2.1. McFarland Çözeltisi

Mc Farland’ın 0.5 numaralı standart çözeltisini hazırlamak için 9.95 ml % 1’lik H_2SO_4 çözeltisine 0.05 ml % 1.175’lik $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ çözeltisi ilave edilmiş ve karıştırılarak bulanıklık elde edilmiştir.

3.5.2.2. Katalaz Çözeltisi

% 2 Hidrojen peroksit

3.5.2.3. % 0.5 Peptonlu Su

Tripton	0.25 g
Pepton	0.25 g
Distile su	100 ml

4. BULGULAR

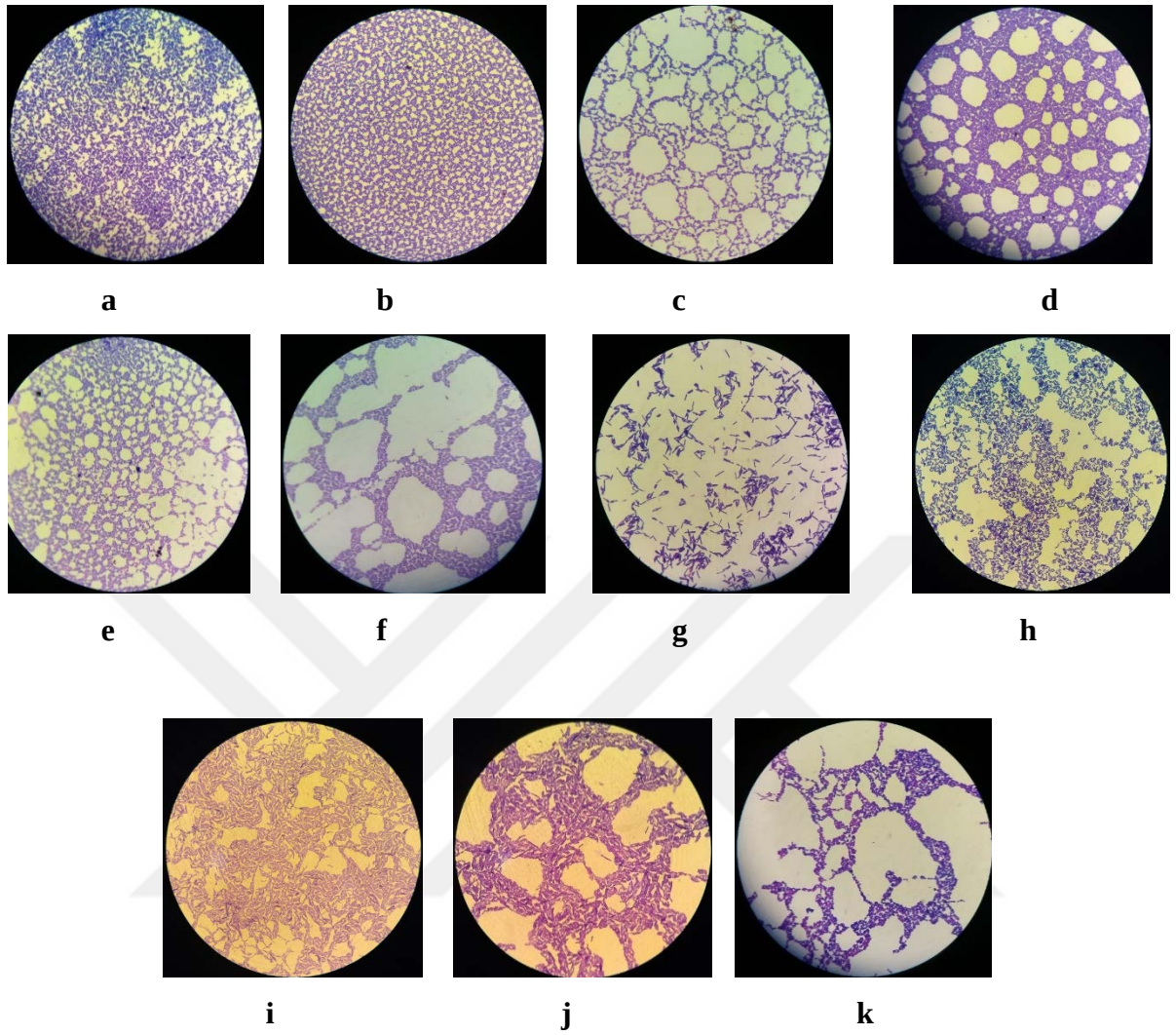
4.1. PROBİYOTİK İÇECEKLERDEN MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYONU VE İDENTİFİKASYONU

Çalışmamızda 5 farklı ticari fermente Türk içeceğinden (boza, kefir, şalgam, ayran, hardaliye) toplam 22 adet laktik asit bakteri izole edilmiştir.

İzole edilen mikroorganizmaların ürünlere göre dağılımı Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Bozadan 8 adet, kefirde 8 adet, şalgamdan 5 adet ve ayrandan 1 adet farklı probiyotik mikroorganizma izole edilmiştir. Farklı ticari markalardan alınan hardaliye örneklerinden, farklı probiyotik seçtirici besiyerlerine ekim yapıldığında mikroorganizma üremesi görülmemiştir. Elde edilen izolatlar morfolojik olarak tanımlanmış, Gram pozitif ve katalaz negatif özellik gösteren bakteri suşları (Şekil 4.1.), dizi analizi yöntemi ile tiplendirilmiştir. Bu izolatların tam isimleri ve test edilen içeceklerdeki dağılımı Tablo 4.2’de gösterilmektedir.

Tablo 4.1: Çalışmamızda analizi yapılan geleneksel Türk probiyotik içeceklerinden izole edilen mikroorganizmalar

İçecek	İzolat kodu	Kullanılan besiyeri
Boza	B3	MRS Agar
	B4	MRS Agar
	B6	MRS Agar
	B7	BSM
	B10	BSM
	B24	SDA
	B25	SDA
	B27	SDA
Kefir	K11	BSM
	K12	BSM
	K13	MRS Agar
	K14	MRS Agar
	K15	MRS Agar
	K18	M17 Agar
	K19	M17 Agar
	K26	SDA
Şalgam	S2	BSM
	S5	MRS Agar
	S8	MRS Agar
	S16	SDA
	S17	M17
Ayran	A22	M17 Agar
Hardaliye	---	MRS Agar
		BSM
		M17 Agar
		SDA



Şekil 4.1: İzole edilen probiyotik organizmalara ait Gram boyama görüntüleri

- a:** *Lactobacillus fermentum* (B3*)
b: *Lactobacillus fermentum* (B4*)
c: *Lactobacillus fermentum* (B6*)
d: *Lactococcus lactis* (B7*)
e: *Lactococcus lactis* (B10*)
f: *Lactobacillus fermentum* (K11*)
g: *Lactobacillus fermentum* (K13*)
h: *Lactobacillus plantarum* (K14*)
i: *Lactococcus lactis* (S2*)
j: *Lactobacillus plantarum* (S8*)
k: *Lactococcus lactis* (K18*)

4.1.1. Moleküler Tiplendirme

Tablo 4.2: Çalışmamızda 16S rRNA dizi analizi ile moleküler tiplendirme ile isimlendirilen Türk probiyotik içeceklerinden izole edilen mikroorganizmalar

İçecek	İzolat	Dizileme sonucu
Boza	B3	<i>Lactobacillus fermentum</i> (% 100)
	B4	<i>Lactobacillus fermentum</i> (% 98.81)
	B6	<i>Lactobacillus fermentum</i> (% 99.37)
	B7	<i>Lactococcus lactis</i> (% 98.97)
	B10	<i>Lactococcus lactis</i> (% 97.14)
	B24	<i>Lactobacillus nagelii</i> (% 87.81)
	B25	<i>Lactobacillus parabuchneri</i> (% 99.05)
	B27	<i>Acetobacter peroxydans</i> (% 94.93)
Kefir	K11	<i>Lactobacillus fermentum</i> (% 99.62)
	K12	<i>Lactobacillus fermentum</i> (% 98.66)
	K13	<i>Lactobacillus fermentum</i> (% 99.25)
	K14	<i>Lactobacillus plantarum</i> (% 98.09)
	K15	<i>Lactobacillus plantarum</i> (%99.80)
	K18	<i>Lactococcus lactis</i> (% 98.24)
	K19	<i>Lactococcus lactis</i> (% 98.24)
	K26	<i>Gluconobacter frateurii</i> (% 99.32)
Şalgam	S2	<i>Lactococcus lactis</i> (% 98.38)
	S5	<i>Lactobacillus pentosus</i> (% 98.86)
	S8	<i>Lactobacillus plantarum</i> (% 99.04)
	S16	<i>Acetobacter pasteurianus</i> (% 89.75)
	S17	<i>Lactobacillus plantarum</i> (% 87.09)
Ayran	A22	<i>Lactococcus lactis</i> (% 99.59)

4.2. PROBİYOTİK İZOLATLARIN ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

4.2.1. İzolatların Antimikrobiyal Aktivitesinin Nokta-Damlatma Yöntemi ile Değerlendirilmesi

Boza, kefir ve şalgamdan izole edilen probiyotik suşlar neredeyse test edilen indikatör patojenlerin tümüne karşı güçlü antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Tablo 4.3) Dahası, Tablo 4.3.'te görüldüğü gibi, elde edilen suşlar hem Gram pozitif (*B. cereus*, MRSA, *S. aureus*, *S. epidermidis*, VRE), hem de Gram negatif (*A. baumannii*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*) bakterilere karşı güçlü antagonistik etki göstermiştir.

Tablo 4.3: Standart patojenlere karşı izolatların antimikrobiyal aktivitesi (Nokta-Damlatma)

Kaynak	Probiyotik İzolatı	İnhibisyon Zonları (mm)										
		<i>A. baumannii</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	MRSA	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	VRE	<i>C. albicans</i>
Boza	B3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	B4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	B6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	B7	0.00	27.70	17.20	16.80	0.00	10.80	16.30	20.50	13.50	6.40	28.60
	B10	0.00	0.00	18.60	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	12.20	0.00	14.20
	B24	20.10	23.80	22.30	21.60	22.10	17.80	22.00	22.20	20.00	21.90	0.00
	B25	24.90	15.50	24.00	23.80	25.90	22.50	20.50	22.30	17.80	21.20	0.00
	B27	26.70	24.60	24.00	20.40	0.00	26.80	25.90	23.40	28.60	20.80	0.00
Kefir	K11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	K12	0.00	11.30	0.00	7.00	0.00	0.00	10.80	10.50	8.80	0.00	0.00
	K13	0.00	0.00	24.30	24.90	26.40	30.10	0.00	0.00	0.00	20.80	11.90
	K14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	K15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	K18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	K19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	K26	27.80	24.20	0.00	25.80	26.00	0.00	0.00	0.00	0.00	22.40	0.00
Şalgam	S2	0.00	11.80	11.30	12.50	12.00	12.80	15.70	9.80	9.60	11.30	0.00
	S5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	S8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	S16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	S17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	A22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Nokta damlatma yöntemine göre bozadan izole edilen *Lactobacillus nagelii* (B24), *Lactobacillus parabuchneri* (B25) ve *Acetobacter peroxydans* (B27) probiyotik suşları, ≥ 20 mm çaplı inhibisyon zonları ile denenen tüm standart suşlara karşı en güçlü antibakteriyel etkinliği göstermiştir. Ancak, bu izolatların *C. albicans* mayasına karşı antifungal aktivite göstermediği tespit edilmiştir.

Bozadan *Lactobacillus nagelii* (B24) ve *Lactobacillus parabuchneri* (B25), kefirde *Lactobacillus fermentum* (K13) ve *Gluconobacter frateurii* ve (K26) izolatları ciddi

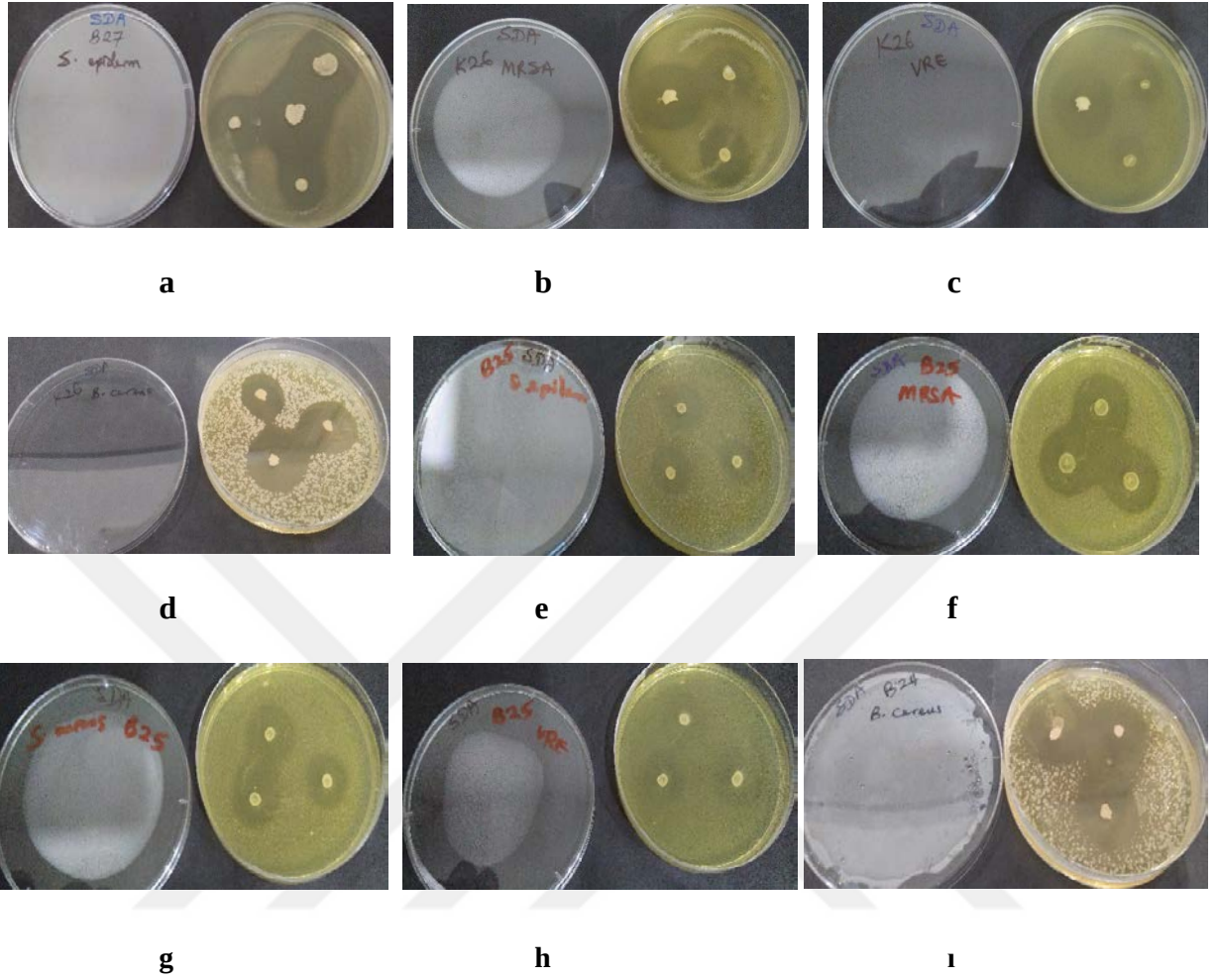
enfeksiyonlara sebep olan ve antibiyotiklere çoklu direnç gösterdiği bilinen MRSA suşuna karşı sırasıyla 22.10; 25.90; 26.40 ve 26.00 mm'lik inhibisyon zonları oluşturduğu, güçlü antibakteriyel etki gösterdiği saptanmıştır. Diğer izolatlardan sadece şalgamdan elde edilen *Lactococcus lactis* (S2) izolatu MRSA' ya orta derecede (≥ 12 mm inhibisyon zonu) antibakteriyel aktivite göstermiştir.

Bozadan izole edilen *Lactococcus lactis* suşları hem bakteri hem de *C. albicans*'a karşı $\geq 10 \leq 20$ mm çaplı inhibisyon zonları ile orta derecede antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

Toplam 22 izolattan sadece bozadan *Lactococcus lactis* (B7, B10) ve kefirden *Lactobacillus fermentum* *C. albicans*'a karşı antifungal aktivite göstermiştir. En güçlü antifungal aktivite 28.60 mm çaplı inhibisyon zonu ile bozadan *Lactococcus lactis* (B7) izolatu ile sağlanmıştır.

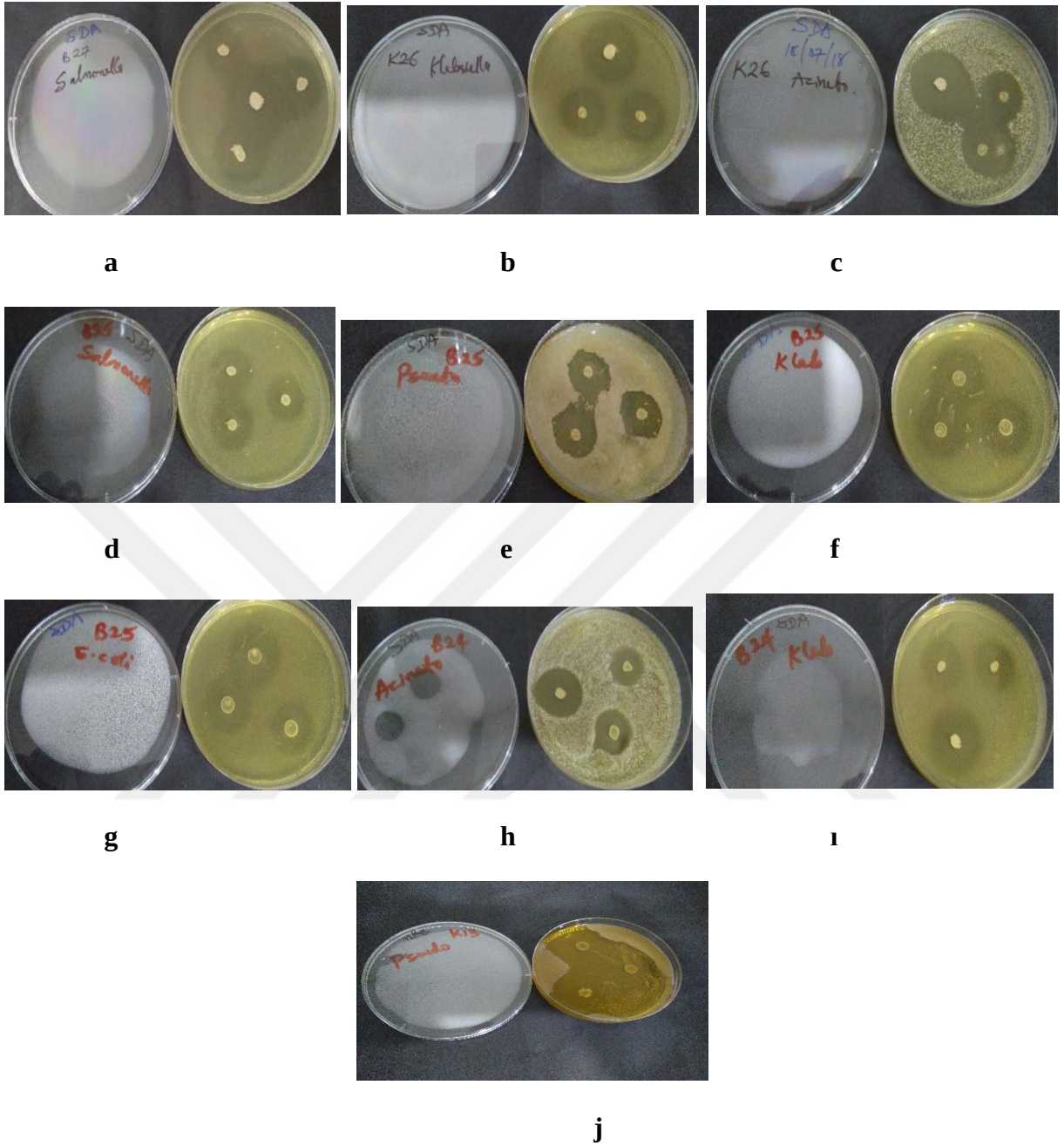
Kefirden izole edilen *Gluconobacter frateurii* (K26) ve *Lactobacillus fermentum* (K13) laktik asit bakteri izolatları yüksek derecede (20.80 -30.10 mm çaplı zonlar) antibakteriyel aktiviteyi göstermişlerdir. Kefirden izole edilen probiyotikler içerisinde en düşük antibakteriyel etkinliği K12 *Lactobacillus fermentum* (< 10 mm'lik inhibisyon) göstermiştir.

Şalgam suyundan izole edilen 5 probiyotikten sadece *Lactococcus lactis* (S2) 9.60-15.70 mm çaplı inhibisyon zonları ile orta derecede antibakteriyel etki sergilemiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.2: Ticari probiyotik Türk fermente içeceklerinden elde edilen probiyotik izolatların Nokta-Damlatma metoduyla Gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyel etkisini gösteren temsilci fotoğraflar

- a:** *Acetobacter peroxydans* (B27)- *S. epidermidis*, **b:** *Gluconobacter frateurii* (K26)- MRSA, **c:** *Gluconobacter frateurii* (K26)- VRE, **d:** *Gluconobacter frateurii* (K26)- *B. cereus*, **e:** *Lactobacillus parabuchneri* (B25)- *S. epidermidis*, **f:** *Lactobacillus parabuchneri* (B25)- MRSA, **g:** *Lactobacillus parabuchneri* (B25)- *S. aureus*, **h:** *Lactobacillus parabuchneri* (B25)- VRE, **i:** *Lactobacillus nagelii* (B24)- *B. cereus*



Şekil 4.3: Ticari probiyotik Türk fermente içeceklerinden elde edilen probiyotik izolatların Nokta-Damlatma metoduyla Gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel etkisini gösteren temsilci fotoğraflar

- a:** *Acetobacter peroxydans* (B27)- *S. typhi*, **b:** *Gluconobacter frateurii* (K26)- *K. pneumoniae*,
c: *Gluconobacter frateurii* (K26)- *A. baumannii*, **d:** *Lactobacillus parabuchneri* (B25)- *S. typhi*,
e: *Lactobacillus parabuchneri* (B25)- *P. aeruginosa*, **f:** *Lactobacillus parabuchneri* B25-*K. pneumoniae*
g: *Lactobacillus parabuchneri* (B25)-*E.coli* , **h:** *Lactobacillus nagelii* (B24)- *A. baumannii*,
i: *Lactobacillus nagelii* (B24)- *K. pneumoniae*, **j:** *Lactobacillus fermentum* (K13)- *P. aeruginosa*



Şekil 4.4: Ticari probiyotik Türk fermente içeceklerinden elde edilen probiyotik izolatın (*Lactococcus lactis* , B7) Nokta-Damlatma metoduyla *C. albicans* antifungal etkisini gösteren temsilci fotoğraf

4.2.2. İzolatların Antimikrobiyal Aktivitesinin Agar Kuyu Diffüzyon Yöntemi ile Değerlendirilmesi

Probiyotiklerin süpernatantlarının antimikrobiyal aktivitesi agar kuyu difüzyon metodu ile değerlendirilmiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4: Standart patojenlere karşı izolatların antimikrobiyal aktivitesi (Agar Kuyu Difüzyon Yöntemi)

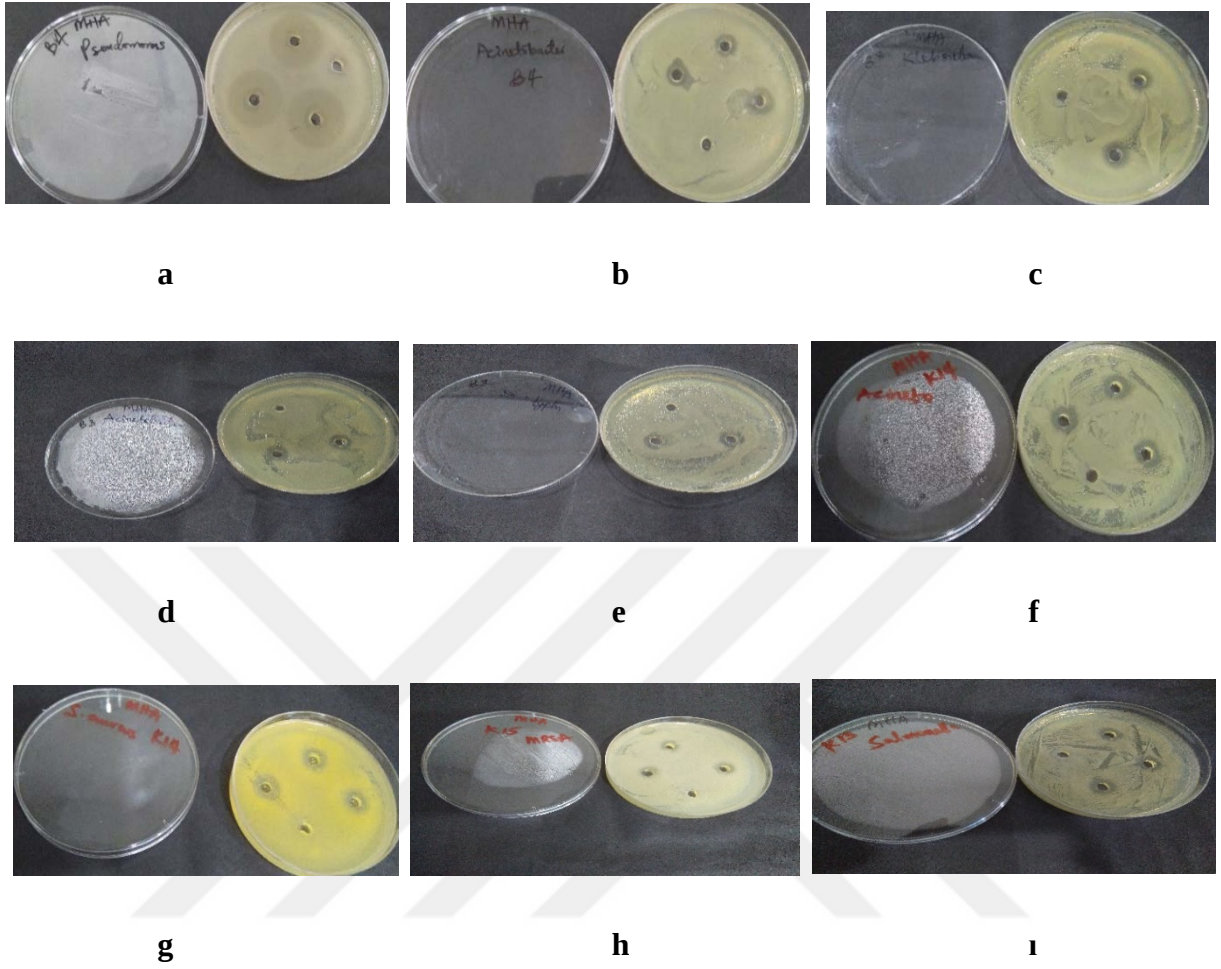
[illegible]

22 izolattan 10 tanesinin süpernatantları $\geq 10 \leq 20$ mm çaplı inhibisyon zonları oluşturarak hem bakteri hem de *C. albicans*'a karşı orta derecede antimikrobiyal aktivite göstermişlerdir. *Lactobacillus fermentum* (B6) izolatından elde edilen süpernatant 25.40 mm çaplı inhibisyon zonu ile *C. albicans* mayasına karşı en yüksek inhibisyonu göstermiştir.

İzole edilen probiyotiklerin süpernatantları arasında en güçlü antibakteriyel aktivite *P. aeruginosa* bakterisine karşı 25.10; 23.40 ve 19.10 çaplı inhibisyon zonları ile sırasıyla B4, *Lactobacillus pentosus* (S5) ve *Lactobacillus plantarum* (S8) laktobasil izolatları ile sağlanmıştır.

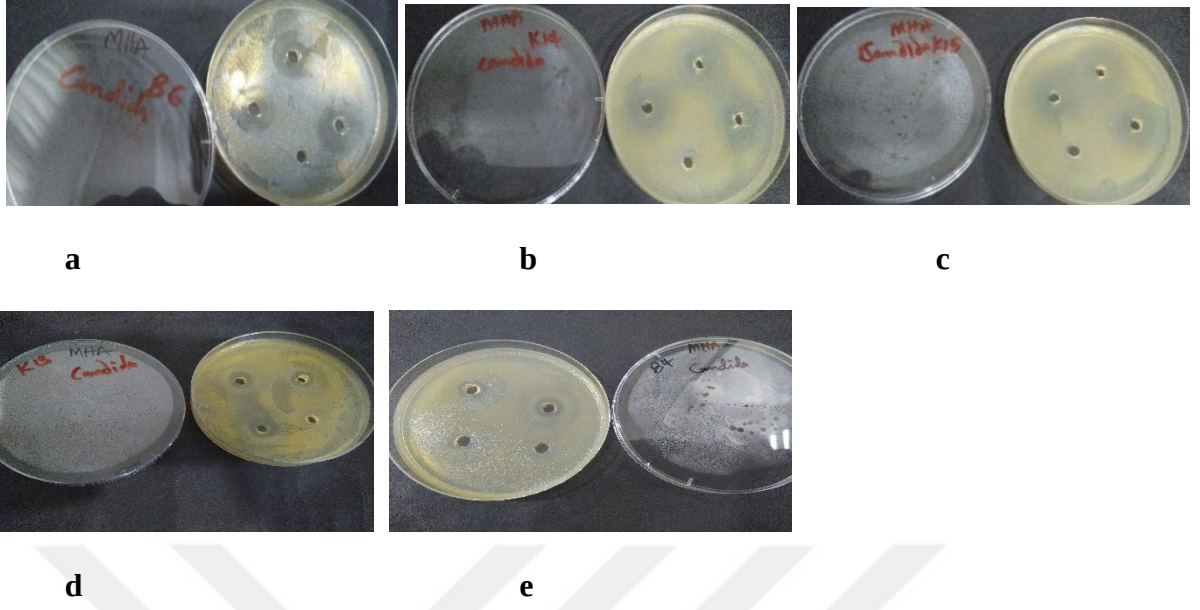
Ayrıca, *Lactococcus lactis* (K18 ve A22), *Lactobacillus fermentum* (B4 ve K13), *Lactobacillus plantarum* (K14 ve K15) izolatları 10.20 – 15.80 mm çaplı inhibisyon zonları ile *C. albicans*'ı orta derecede inhibe etmiştir.

En düşük antibakteriyel aktivite 8.30 mm'lik inhibisyon zonu ile *Lactococcus lactis* (K18) ve *Lactobacillus plantarum* (S8) bakterilerinin süpernatantları ile sırasıyla *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae* standart suşlarına karşı elde edilmiştir (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).



Şekil 4.5: Agar kuyu difüzyon yöntemiyle izolatların antibakteriyel etkisi

- a:** *Lactobacillus fermentum* (B4)- *P. aeruginosa*, **b:** *Lactobacillus fermentum* (B4)- *A. baumannii*,
c: *Lactobacillus fermentum* (B3)- *K. pneumoniae*, **d:** *Lactobacillus fermentum* (B3)- *A. baumannii*,
e: *Lactobacillus fermentum* (B3)- *S. typhi*, **f:** *Lactobacillus plantarum* (K14)- *A. baumannii*
g: *Lactobacillus plantarum* (K14)- *S. aureus*, **h:** *Lactobacillus plantarum* (K15)- MRSA,
i: *Lactobacillus fermentum* (K13)- *S. typhi*.



Şekil 4.6: *Candida albicans*'a karşı izolatların antifungal etkisi

a: *Lactobacillus fermentum* (B6), **b:** *Lactobacillus plantarum* (K14), **c:** *Lactobacillus plantarum* (K15),
d: *Lactobacillus fermentum* (K13), **e:** *Lactobacillus fermentum* (B4)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünya genelinde insanlar sadece lezzetli gıdalar değil, sağlığa faydalı etki sağlayan fonksiyonel gıdalara ihtiyaç duymaktadır. Fonksiyonel gıdalar geleneksel yiyecekler, modifiye edilmiş yiyecekler, tedavi edici yiyecekler ve özel diyet kullanımına yönelik yiyecekleri içermektedir (Diplock ve diğ., 1999; ADA 2009). Bu fonksiyonel gıdalar arasında da probiyotik (yararlı mikroorganizma) içeren gıdaların en dikkat çeken ve geniş grubu olduğu ve insan hayatının sürdürülmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Probiyotik fonksiyonel gıdalar, insan sağlığına olumlu etkisi nedeni ile ilk sırada tercih edilmektedir (Homayouni ve diğ., 2012a).

Probiyotik ürünlerin antimikrobiyal aktivite, gastrointestinal enfeksiyonların tedavisi, akut diyare, antibiyotikle ilişkili diyare ve rotaviral diyare dahil olmak üzere insan sağlığı üzerinde bir takım yararlı etkileri olduğu bilinmektedir. Dahası, probiyotikler laktoz intoleransının azaltılmasına, enflamatuar bağırsak hastalıklarının önlenmesine ve tedavisine yardımcı olup anti-*Helicobacter pylori* aktivitesine, antikarsinojenik ve antimutajenik özelliklere sahiptir. Ayrıca, probiyotikler serum kolesterolünün azaltılmasına, bağışıklık sisteminin modülasyonuna yardımcı olup azoredüktaz ve nitroredüktaz gibi bazı kolonik enzimlerin aktivitesini azaltmaktadır (Ambalam ve diğ., 2011).

Probiyotiklerin antimikrobiyal yeteneği, hem insan sağlığı üzerindeki yararlı etkisi, hem de probiyotik suşların seçilme kriterlerinden biri olması nedeniyle son derecede önemlidir. Probiyotiklerin önemli etki mekanizmalarından biri antimikrobiyal metabolitleri üreterek mikrobiyal patojenlere karşı antagonistik etki göstermesidir. Çalışmamızda bu antagonistik etkiyi temel alarak geleneksel fermente Türk probiyotik içeceklerinden izole edilen probiyotiklerin farklı insan patojenleri (*S.aureus* ATCC 6538, *S. epidermidis* ATCC 1228, MRSA ATCC 33591, VRE ATCC 51299, *B. cereus* ATCC 14579, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 4352, *A. baumannii* ATCC 19606, *S. typhi* ATCC 14028, *P. aeruginosa* ATCC 9027 ve *C. albicans* ATCC 10231) üzerine etkisi test edilmiştir.

Çalışmamızda incelenen fermente geleneksel Türk içeceklerinin (boza, kefir, şalgam ve ayran) probiyotik organizmaları içerdikleri tespit edilmiştir. En çok probiyotik mikroorganizma bozadan (8 adet) izole edilmiştir. Bunu sırasıyla kefir (8 adet), şalgam (5 adet), ayran (1 adet) ve hardaliye (0 adet) izlemiştir. Ayrandan bir adet bakteri izole edilmiştir. Türkiye genelinde çalışmamızda test edilen fermente ürünlerden en yaygın tüketileni ayrandır, bu nedenle uygun

Bifidobacterium ve *Lactobacillus* türleri eklenerek ayranın probiyotik özelliğinin ve sağlığa etkisinin güçlendirilmesi önerilmektedir (Kök-Taş ve Güzel-Seydim, 2010).

Çalışmamızda ticari olarak yaygın tüketimi olan hardaliyeden hiç probiyotik mikroorganizma izole edilmemiştir. Bu durumun, fermentasyon işleminin ilk anından itibaren ortama eklenen koruyucu sodyum benzoat varlığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Probiyotiklerin canlı olarak ve yeterli miktarlarda nihai ürünlerde bulunması önemli şart olduğu için ticari hardaliyenin probiyotik içecek nitelikli olmadığı belirlenmiştir. Dolayısıyla, ticari hardaliyenin gerçek probiyotik gıda hale getirilebilmesi için ileri çalışmalarda sodyum benzoata dirençli starter kültür ve probiyotik suşların araştırılması önerilebilir. Ayrıca, birkaç şalgam örneğinden de probiyotik mikroorganizmalar çıkmamıştır. Bu durumun da, hardaliye örneklerindeki benzer şekilde ürüne eklenen sodyum benzoat gibi koruyucu katkı maddelerinin varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışma kapsamında seçici besiyerleri kullanılarak izole edilen probiyotik suşların, standart insan patojeni suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitesi nokta damlatma ve agar kuyu difüzyon olmak üzere iki farklı yöntemle değerlendirilmiştir. Önerilen tez çalışması ile konu hakkında araştırmaların derinleştirilmesi ve yerli fermente probiyotik içeceklerin insan sağlığı üzerindeki potansiyel yararlı etkileri hakkında değerlendirme yapılabilecektir.

Probiyotiklerin sağladığı sağlık yararlarının suşa özgü olduğu, türe veya cinse özgü olmadığı bilinmektedir. İzole edilen probiyotik suşların 18 tanesinin (B3, B4, B6, B7, B10, B24, B25, B27, K12, K13, K14, K15, K18, K26, S2, S5, S8 ve A22) test edilen patojenlere karşı farklı derecede antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu bulgu probiyotik mikroorganizmaların antagonistik etkisinin, izole edilen suşa ve hedef patojene spesifik olduğunu doğrulamaktadır (Shah, 2007). Ayrıca dizileme ile aynı cins olduğu belirlenen izolatların dahi antibakteriyel etkisinde farklılıklar tespit edilmiştir. Bu durum, gerek mikroorganizmanın davranışı, ürettiği metabolitler hatta antimikrobiyallere karşı organizmanın hassasiyeti açısından daha önceki araştırmacılar tarafından da suş düzeyinde farklılık olarak doğrulanmıştır. Bu bakımdan, hiçbir probiyotiğin bilinen tüm olumlu sağlık etkilerini tek başına sağlayamayacağı, bu sebeple de farklı probiyotiklerin karışımının beslenmeye dahil etmek gerekliliği yorumu çıkarılabilir.

Çalışmada uygulanan iki yöntemle edinilen antimikrobiyal aktivite test bulguları kıyaslandığında, antimikrobiyal aktivitenin tayininde nokta damlatma ekim yönteminin agar

kuyu difüzyon yönteminden daha etkin olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu Cadirci ve Citak (2005) tarafından rapor edilen bulgular ile uyumludur. Cadirci ve Citak (2005) bu iki yöntemi kullanarak LAB şuşlarının Gram negatif bakterilere karşı antagonistik etkilerini inceleyip nokta damlatma yöntemi daha etkin bulmuştur. Ancak, Rahimifard ve Naseri (2016), *Bifidobacterium bifidum* probiyotik suşunun *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* indikatör patojenine karşı inhibisyon aktivitesi tayininde, agar kuyu difüzyon yönteminin disk difüzyon ve nokta-damlatma yöntemine nazaran daha etkili olduğunu belirtmişlerdir. Antimikrobiyal aktivite testlerine ait bulgulardaki bu farklılıklar, nokta-damlatma yönteminde kullanılan probiyotik izolatların miktarı (kob/ml) ve/veya bakteriyosin miktarından kaynaklanabilir. Agar kuyu difüzyon yönteminde ise probiyotiklerin üretmiş olduğu antimikrobiyal metabolitlerin difüze olabilme yeteneğinden ve bakteriyosin aktivitesinden kaynaklanabilir (Choyam ve diğ., 2015; Halder ve diğ., 2017).

B7, B10, B27, K26, B24, K13, K12, B25 ve S2 izolatları nokta-damlatma yöntemi ile daha iyi antibakteriyel aktivite sergilemiştir. Bu antimikrobiyal etkinin, laktik asit, asetik asit, diasetil, bakteriyosin ve hidrojen peroksit gibi izolatlar tarafından üretilen tüm metabolitlerin sinerjistik etkisinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, B7, B10 ve K13 izolatları nokta-damlatma yöntemiyle *Candida albicans*'a karşı antifungal aktivite göstermiş, fakat agar kuyu metodu ile aynı etki gözlenememiştir. Agar kuyu difüzyon yöntemiyle olumlu sonuç göstermemeleri birincil metabolit olarak bakteriyosinleri salgılamamalarından, yahut da salgıladıkları metabolitlerin difüze olamamasından kaynaklanabilir. Çalışmanın bu soruları gidermesi için detaylandırılması gerekmektedir.

Farklı olarak, K14, K15, B4, B6, K18, B3, S5 ve S8 izolatları agar kuyu difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal aktivite göstermişler ancak, nokta-damlatma yöntemiyle etki göstermemiştir. Nokta-damlatma yöntemiyle olumsuz sonuç gösterdiklerine göre bakteriyosinden başka bir birincil veya sekonder metabolit salgılamadıkları düşünülmektedir.

Bu çalışmada, boza ve kefirin test edilen diğer örneklerle kıyasla daha çok probiyotik içeren fermente geleneksel Türk içecekleri olduğu belirlenmiştir. Üstelik test edilen insan patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivite bakımından da bu iki ürünün daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu açıdan da birçok hastalığın tedavisi ve/veya önlenmesi için boza ve kefirin düzenli olarak yeterli miktarda tüketilmesi önerilebilir. Probiyotikler ve/veya antioksidanlar

gibi diğerk sağlığa faydalı maddeleri içerdiklerinden boza, kefir, şalgam ve hardaliyenin fonksiyonel gıdalar oldukları veya nūtrasötikler olarak kullanılabildikleri söylenebilir.

Bildiđimiz kadarıyla bu çalışma, geleneksel fermente Tūrk içeceklerinden probiyotik mikroorganizma izolasyonu ve farklı patojenlere karşı probiyotik izolatların antimikrobiyal etkisinin araştırılması hakkında ilk çalışmadır. Diğerk yandan, probiyotiklerin sečilmesinde en önemli kriterlerden biri olan antimikrobiyal aktivite göstermesi, bu organizmaların probiyotik katkı olarak kullanımı için tek başına yeterli değildir. İleri çalışmalarda diğerk probiyotik özelliklerinin incelenmesi gerekmektedir.



KAYNAKLAR

ADA—American Dietetic Association, 2009, Position of the American Dietetic Association: functional foods. *J Am Diet Assoc*, 109, 735–46.

Aguirre, M., Collins, M. D., 1993, Lactic acid bacteria and human clinical infection, *J Appl Bacteriol*, 75, 95-107.

Akpinar-Bayizit, A., Yilmaz-Ersan, L., Ozcan, T., 2010, Determination of boza's organic acid composition as it is affected by raw material and fermentation, *International Journal of Food Properties*, 13 (3), 648–656.

Aktas, S., Haskoylu, A., Gunes, E., 2015, Nutritional properties of hardaliye. In Proceedings of the 3rd International Symposium on Traditional Foods from Adriatic to Caucasus, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, 1–4 October, 2015.

Altay, F., Karbancioglu-Güler, F., Daskaya-Dikmen, C., Heperkan, D., 2013, A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics, *International Journal of Food Microbiology*, 167, 44–56.

Ambalam, P, Dave, J. M., Nair, B. M., Vyas, B. R. M., 2011, In vitro Mutagen Binding and Antimutagenic Activity of Human *Lactobacillus rhamnosus* 231, *Anaerobe*, 17, 217-222.

Andersson, H., Asp, N. G., Bruce, A., Roos, S., Wadstrom, T., Wold, A. E., 2001, Health effects of probiotics and prebiotics: A literature review on human studies, *Scand J Nutr*, 45, 58-75.

Annou S., Maqueta, M., Marti´nez-Bueno, M., Valdivia, E., 2007, Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods, *Appl Microbiol*, 1, 475–486.

Applied Biosystems (2008) BigDyeR Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol, Rev A. Search for P/N 4337035 at www.appliedbiosystems.com.

Applied Biosystems (2008) BigDyeR XTerminator™ Purification Kit Protocol Summary. Search for P/N 107PR04-01 at www.appliedbiosystems.com.

Arai, S., 1996, Studies on functional foods in Japan—state of the art. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 60, 9–15.

Arici, M., 2004, Microbiological and chemical properties of a drink called shalgam. *Ernahrungs Umschau*, 51 (1), 10.

Arici, M., Coskun, F., 2001, Hardaliye: fermented grape juice as a traditional Turkish beverage, *Food Microbiology*, 18, 417–421.

Arici, M., Daglioglu, O., 2002, Boza: a lactic acid fermented cereal beverage as a traditional Turkish food. *Food Reviews International*, 18 (1), 39–48.

- Aydogdu, H., Yildirim, S., Halkman, A.K., Durgun, T., 2014, A study on production and quality criteria of hardaliye: A traditional drink from Thrace Region of Turkey, *Gida*, 39, 139–145. (In Turkish).
- Baschali, A., Tsakalidou, E., Kyriacou, A., Karavasiloglou, N., Matalas, A-L., 2017, Traditional low-alcoholic and non-alcoholic fermented beverages consumed in European countries: a neglected food group, *Nutrition Research Reviews*, 30, 1–24.
- Begum, P. S., Madhavi, G., Rajagopal, S., Viswanath, B., Razak, M. A., Venkataratnam V., 2017, Probiotics as Functional Foods: Potential Effects on Human Health and its Impact on Neurological Diseases, *Int J Nutr Pharmacol Neurol Dis*, 7, 23-33.
- Blandino, A., Al-Aseeri, M. E., Pandiella, S. S., Cantero, D., Webb, C., 2003, Cereal-based fermented foods and beverages, *Food Research International*, 36, 527–543.
- Boylston, T. D., Vinderola, C. G., Ghoddusi, H. B., Reinheimer, J. A., 2004, Incorporation of Bifidobacteria into cheeses: Challenges and rewards, *Int Dairy J*, 14, 375-87.
- Cadirci, B. H., Citak, S. A., 2005, Comparison of two methods used for measuring antagonistic activity of lactic acid bacteria, *Pak. J. Nutr.*, 4, 237–241.
- Canbas, A., Deryaoglu, A., 1993, A research on the processing techniques and characteristics of shalgam beverage, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 17, 119–129.
- Caplice, E., Fitzgerald, G. F., 1999, Food fermentations, Role of microorganisms in food production and preservation, *Int. J. Food Microbiol.*, 50, 131–149.
- Caramia, G., Atzei, A., Fanos, V. (2008). Probiotics and the skin. *Clinics in Dermatology*, 26(1): 4-11.
- Cetinkaya, F., Elal-Mus, T., 2012, Determination of microbiological and chemical characteristics of kefir consumed in Bursa, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi (Veterinary Journal of Ankara University)* 59: 217–221.
- Choyam, S., Lokesh, D., Kempaiah, B. B., Kammara, R., 2015, Assessing the antimicrobial activities of Ocins. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1034.
- Coskun, F., Arici, M., 2006, The effects of using different mustard seeds and starter cultures on some properties of hardaliye, *Ann. Microbiol*, 56, 335.
- Crittenden, R. G., 1999, Prebiotics. In: Tannock, G. W. (Ed.). *Probiotics: a critical review*, Norfolk: Horizon Scientific Press, 141-156.
- Cruz, A. G., Faria, J. A. F., Walter, E. H. M., Andrade, R. R., Cavalcanti, R. N., Oliveira, C. A. F., et al., 2010, Processing optimization of probiotic yogurt containing glucose oxidase using response surface methodology, *Journal of Dairy Science*, 93, 5059–5068.
- Das, L., Bhaumik, E., Raychaudhuri, U., Chakraborty, R., 2012, Role of nutraceuticals in human

- de Carvalho, A. F., Araujo, E. A., Pires, A. C. S., Pinto, M. S., Jan, G., 2012, Probiotics in dairy fermented products. *licensee InTech*. Chapter 6, pp 129-144. <http://dx.doi.org/10.5772/51939>.
- de Vrese, M., Schrezenmeir, J., 2008, Probiotics, prebiotics, and synbiotics, *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 111, 1-66.
- De Vuyst, L., Leroy, F., 2007, Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 13 (4), 194–199.
- Diplock, A. T., Agget, P. J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E. B., Roberfroid, M. B., 1999, Scientific concepts of functional foods in Europe, Consensus document, *Brit. J. Nutr*, 81, 1–27.
- Dogan, M., Ozpinar, H., 2017, Investigation of Probiotic Features of Bacteria Isolated from Some Food Products, *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 23 (4), 555-562.
- Erten, H., Tangüler, H., Canbas, A., 2008, A traditional Turkish lactic acid fermented beverage: Shalgam (salgam), *Food Reviews International*, 24, 352–359.
- FAO/WHO 2001, Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria Cordoba, Argentina. 1-4 October.
- Fawzya, Y. N., 2010, Preservative nisin: Application in fishery products, *Squalen*, 5 (3), 79–85.
- Figuerola-González, I., Cruz-Guerrero, A., Quijano, G., 2011, The Benefits of Probiotics on Human Health, *J Microbial Biochem Technol*, S1:003.
- Galdeano, C. M., Perdigon, G., 2006, The Probiotic Bacterium *Lactobacillus casei* induces Activation of the Gut Mucosal Immune System through Innate Immunity, *Clin Vaccine Immunol*, 13, 219-226.
- Garrote, G. L., Abraham, A. G., De Antoni, G. L., 2001, Chemical and microbiological characterization of kefir grains, *The Journal of Dairy Research*, 68, 639–652.
- Gibson, G. R., Fuller, R., 2000, Aspects of In Vitro and In Vivo Research Approaches Directed Toward Identifying Probiotics and Prebiotics for Human Use, *The Journal of Nutrition*, 130 (2), 391–395. <https://doi.org/10.1093/jn/130.2.391S>.
- Gibson, R. G., Roberfroid, M. B., 1995, Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics, *J. Nutr.*, 125, 1401–1412.
- Gil, M. I., Tomas-Barberan, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., Kader, A. A., 2000, Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 4581–4589.
- Gorski, D., 1994, Kefir: 21st century yogurt? *Dairy Foods*, 95, 49.
- Gotcheva, V., Pandiella, S. S., Angelov, A., 2001, Monitoring the fermentation of the traditional Bulgarian beverage boza, *Int J Food Sci Technol*, 36, 129–134.

- Gotcheva, V., Pendiella, S. S., Angelov, A., Roshkova, Z. G., Webb, C., 2000, Microflora identification of the Bulgarian cereal-based fermented beverage boza, *Process Biochemistry*, 36, 127–130.
- Gupta, S., Abu-Ghannam, N., 2012, Probiotic fermentation of plant based products: Possibilities and opportunities, *Crit Rev Food Sci Nutr*, 52, 183-99.
- Guzel-Seydim, Z., Kök-Taş, T., Greene, A. K., 2010, Kefir and koumiss: Microbiology and technology. In: Yildiz F (ed) *Development and Manufacture of Yogurt and Functional Dairy Products*. CRC Press, Boca Raton, U.S., pp 143–163.
- Halder, D., Mandal, M., Chatterjee, S. S., Pal, N. K., Mandal, S., 2017, Indigenous Probiotic *Lactobacillus* Isolates Presenting Antibiotic like Activity against Human Pathogenic Bacteria, *Biomedicines*, 5, 31. DOI: 10.3390/biomedicines5020031.
- Hancioglu, O., Karapinar, M., 1997, Microflora of boza, a traditional fermented Turkish beverage, *International Journal of Food Microbiology*, 35, 271–274.
- Hasler, C. M., 2002, Functional Foods: Benefits, Concerns and Challenges—A Position Paper from the American Council on Science and Health, *J. Nutr.*, 132, 3772–3781.
- Das, L., Bhaumik, E., Raychaudhuri, U., Chakraborty, R., 2012, Role of nutraceuticals in human Health, *J Food Sci Technol*, 49, 173–183.
- Hechard, Y., Sahl, H. G., 2002, Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria, *Biochim*, 84, 545–557.
- Hennessy, M., What's Driving Growth in Functional Food and Beverages? A Convergence of Nutrition, Convenience and Taste. <http://www.nutraingredients-usa.com/Markets/Whats-driving-growth-in-functional-food-and-beverages-Aconvergence-of-nutrition-convenience-and-taste>. [Son Ziyaret Tarihi: 14 Şubat, 2014].
- Homayouni, A., Ehsani, M. R., Azizi, A., Razavi, S. H., Yarmand, M. S., 2008, Growth and survival of some probiotic strains in simulated ice cream conditions, *Journal of Applied Sciences*, 8 (2), pp. 379-382.
- Homayouni, A., Maedeh, A., Hossein, A., Vahid, Z., 2012a, Functional Dairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products, *licensee InTech*, pp. 198-212.
- Homayouni, A., Azizi, A., Javadi, M., Mahdipour, S., Ejtahed, H., 2012b, Factors influencing probiotic survival in ice cream: A Review, *International Journal of Dairy Science*, DOI: 10.3923/ijds.2012.
- Incedayi, B., Uylaser, V., Copur, U., 2008, A traditional Turkish beverage shalgam: manufacturing technique and nutritional value, *J. of Food, Agriculture & Environment*, 6, 31–34.
- Jacob, F., Lwoff, A., 1953, In: Siminovitch L and Wallman E., Lysogeny. *Bacteriology Reviews*, 4, 269-337.

- Kabak, B., Dobson, A. D. W., 2011, An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 248–260.
- Kammerer, D., Carle, R., Schieber, A., 2004, Quantification of anthocyanins in black carrot extracts (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) and evaluation of their color properties. *European Food Research and Technology*, 219, 479–486.
- Karimi, R., Mortazavian, A. M., Cruz, A. G., 2011, Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: A review, *Dairy Sci Technol*, 91, 283–308.
- Karpiński, T. M., Szkaradkiewicz, A. K., 2013, Characteristic of bacteriocins and their application, *Pol J Microbiol*, 62 (3), 223–225.
- Kaur, P. I., Chopra, K., Saini, A., 2002, Probiotics: potential pharmaceutical applications, *Eur J Pharm Sci*, 15, 1–9.
- Kesmen, Z., Kacmaz, N., 2011, Determination of lactic microflora of kefir grains and kefir beverage by using culture-dependent and culture-independent methods, *Journal of Food Science*, 76, 276–283.
- Kivanc, M., Yilmaz, M., Cakir, E., 2011, Isolation and identification of lactic acid bacteria from boza, and their microbial activity against several reporter strains, *Turkish Journal of Biology*, 35, 313–324.
- Knorr, D., 1998, Technology aspects related to microorganisms in functional foods, *Trends Food Sci Technol*, 9, 295–306.
- Kocak, C., Avsar, Y. K., 2009, Ayran: Microbiology and Technology. In: Yildiz, F. (Ed.), *Development and Manufacture of Yogurt and Functional Dairy Products*. Boca Raton, U.S.: CRC Press, pp. 123–141.
- Koletzko, B., Aggett, P. J., Bindels, J. G., 1998, Growth, development and differentiation: a functional food science approach, *Brazilian Journal of Nutrition*, 80, pp. 35–45.
- Kołozyn-Krajewskaa, D., Dolatowski, Z. J., 2012, Probiotic meat products and human nutrition, *Process Biochem*, 47, 1761–72.
- Korbekandi, H., Mortazavian, A. M., Iravani, S., 2011, Technology and stability of probiotic in fermented milks. In: Shah, N. P., Cruz A. G., Faria J. A., ed. *Probiotic and Prebiotic Foods: Technology, Stability and Benefits to the Human Health*, New York: Nova Science Publishers, p. 131–69.
- Kök-Tas, T., Guzel-Seydim, Z., 2010, Determination of effects of using fat replacers and probiotic on ayran quality, *Gida (Food)*, 35 (2), 105–111 (in Turkish).
- Kök-Tas, T., Guzel-Seydim, Z., 2010, Determination of effects of using fat replacers and probiotic on ayran quality, *Gida (Food)*, 35 (2), 105–111. (in Turkish).

- Leite, A. M. O., Miguel, M. A., Peixoto, R. S., Rosado, A. S., Silva, J. T., Paschoalin, V. M., 2013, Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: A natural probiotic beverage. *Braz. J. Microbiol.*, 44, 341–349.
- Lopitz-Otsoa, F., Rementeria, A., Elguezabal, N., Garaizar, J., 2006, Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities, *Rev. Iberoam. Micol.*, 23, 67-74.
- Lourens-Hattingh, A. Viljoen, B. C., 2001a, Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products, *Food Research International*, 34, 791–796.
- Lourens-Hattingh, A., Viljoen, B. C., 2001b, Yogurt as probiotic carrier food, *International Dairy Journal*, 11, 1–17.
- Marsh, A. J., Hill, C., Ross, R. P., 2014, Fermented beverages with health-promoting potential: past and future perspectives, *Trends Food Sci Technol*, 38, 113–124.
- Mercenier, A., Pavan, S., Pot, B., 2003, Probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospects, *Curr Pharm Design*, 8, 99-110.
- Metchnikoff, E., 1908, Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. In: *The prolongation of life: Optimistic studies*, W. Heinemann. Springer Publishing Company, London, 161-183.
- Morelli, L., 2007, In vitro assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality, *Int Dairy J*, 17, 1278-83.
- Mountzouris, K. C., Gibson, G. R., 2003, Colonization of the gastrointestinal tract, *Annales Nestle*, 61, pp. 43-54.
- Naidu, A. S., Biblack, W. R., Clemens, R. A., 1999, Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB), *Crit Revs Food Sci & Nutr*, 39, 13-126.
- Olveira, G., González-Molero, I., 2016, An update on probiotics, prebiotics and symbiotics in clinical nutrition, *Endocrinol. Nutr*, 63, 482–494.
- Ong, L., Henriksson, H., Shah, N. P., 2006, Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and their influence on proteolytic patterns and production of organic acid, *Int Dairy J*, 16, 446-56.
- Otles, S., Cagindi, O., 2003, Kefir: a probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects, *Pakistan Journal of Nutrition*, 2, 54–59.
- Özdestan, O., Üren, A., 2010, Biogenic amine content of kefir: a fermented dairy product, *European Food Research and Technology*, 231, 101–107.
- Perez, R. H., Zendo, T., Sonomoto, K., 2014, Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications, *Microbial Cell Factories*, 13 (Suppl 1):S3 <http://www.microbialcellfactories.com/content/13/S1/S3>.

- Pithva, S., Ambalam, P., Dave, J. M., Vyas, B. R. M., 2011, Antimicrobial Peptides of Probiotic *Lactobacillus* strains. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. A. Méndez-Vilas (Ed). pp. 987-991.
- Prado, F. C., Parada, J. L., Pandey, A., Soccol, C. R., 2008, Trends in non-dairy probiotic beverages, *Food Research International*, 41, 111–123.
- Rahimifard, N., Naseri, M., 2016, Evaluation and comparison of three antimicrobial activity methods using *Bifidobacteria bifidum* and *Bifidobacterium infantis* as probiotic bacteria against *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis*, *J. Bacteriol. Mycol.*, 2, 00024. [CrossRef].
- Ranadheera, C. H., Vidanarachchi, J. K., Rocha, R. S., Cruz, A. G., Ajlouni, S., 2017, Probiotic Delivery through Fermentation: Dairy vs. Non-Dairy Beverages, *Fermentation*, 3 (67), 1-17.
- Reid, G., Burton, J., 2002, Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria, *Microbes and Infection*, 4, 319–324.
- Reid, G., Jessica, A., Younes, J. A., Van Der Mei, H. C., Gloor, G. B., Knight, R., Busscher, H. J., 2011, Gut flora restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities, *Nature Reviews*, 9, 27-38.
- Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., Penna, A. L. B., 2012, Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Eng Rev.*, 4:124–140 DOI: 10.1007/s12393-012-9051-2.
- Ripamonti, B., Agazzi, A., Bersani, C., De Dea, P., Pecorini, C., Pirani, S., Rebucci, R., Savoini, G., Stella, S., Stenico, A., Tirloni, E., Domeneghini, C., 2011, Screening of species-specific lactic acid bacteria for veal calves multi-strain probiotic adjuncts, *Anaerobe*, 17, 97–105.
- Romond, M. B., Haddon, Z., Mialcareck, C., Romond, C., 1997, Bifidobacteria and human health: Regulatory effect of indigenous bifidobacteria on *Escherichia coli* intestinal colonization, *Anaerobe*, 3, 131-136.
- Ross, R. P., Morgan, S., Hill, C., 2002, Preservation and fermentation: past, present and future, *Int. J. Food Microbiol.*, 79, 3-16.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J., Mattila-Sandholm, T., 2000, Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties, *Journal of Biotechnology*, 84, 197–215.
- Salminen, M. K., Järvinen, A., Saxelin, M., Tynkkynen, S., Rautelin, H., Valtonen, V., 2001, Increasing consumption of *Lactobacillus* GG as a probiotic and the incidence of lactobacilli bacteraemia in Finland, *Clin Microbiol Infect.*, 7, (Suppl 1), 802.
- Saxelin, M., Rautelin, H., Salminen, S., Mäkelä, P. H., 1996, The safety of commercial products with viable *Lactobacillus* strains, *Infect Dis Clin Pract.*, 5(5), 331-335.
- Senok, C. A., Ismaeel, Y. A., Botta, G. A., 2005, Probiotics: facts and myths, *Clin Microbiol Infect* 11, 958-966.

Shah, N. P., 2007, Functional cultures and health benefits, *International Dairy Journal*, 17, 1262–1277.

Sharma and Saharan, 2014, Simultaneous production of biosurfactants and bacteriocins by probiotic *Lactobacillus casei* MRTL3, *Int J Microbiol.*, 1 (7), 698-713.

Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, T., Frengova, G., Spasov, Z., 2002, Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 1-6.

Sveje, M., 2007, Probiotic and prebiotics – Improving consumer health through food consumption, *Nutracos*, 28-31.

Tagg, J. R., Dajani, A. S., Wannamaker, L. W., 1976, Bacteriocins of Gram-positive bacteria, *Bacteriology Reviews*, 40, 722-756.

Tamime, A.Y., 2006, Production of Kefir, Koumiss and Other Related Products, In: Tamime, AY (ed.), *Fermented Milk*. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd, p.174-216.

Tangüler, H., Erten, H., 2012, Occurrence and growth of lactic acid bacteria species during the fermentation of shalgam (salgam), a traditional Turkish fermented beverage, *LWT — Food Science and Technology*, 46, 36–41.

Tannock, G. W., 1994, More than a smell: The complexity of the normal microflora, In “*Normal Microflora. An Introduction to Microbes Inhabiting the Human Body*,” ed. Tannock, G. W., London: Chapman and Hall, pp 1–36.

Tannock, G. W., 1999, Analysis of the intestinal microflora: A renaissance, *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 265-278.

TFC, 2009, Turkish Food Codex, fermented milk products, *Turkish Food Codex Regulations*, Regulation No: 2009/25, Republic of Turkey Ministry of Food, Agriculture and Livestock, Ankara, Turkey.

Tissier, H., 1906, Traitement des infections intestinales par lam´ethode de la flore bact´erienne de l’intestin, *CR Soc Biol*, 60, 359–361.

Todorov, S., Botes, M., Guigas, C., 2008. Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria, *J Appl Microbiol*, 104 (2), 465–477.

Tour´e, R., Kheadr, E., Lacroix, C., Moroni, O., Fliss, I., 2003, Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*, *Journal of Applied Microbiology*, vol. 95, no. 5, pp. 1058–1069.

Vasiljevic, T., Shah, N. P., 2008, Probiotics –From Metchnikoff to bioactives, *Int Dairy J*, 18, 714-728.

- Witthuhn, R. C., Schoeman, T., Britz, T. J., 2005, Characterisation of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation, *International Dairy Journal*, 15, 383–389.
- Yang, S. C., Lin, C. H., Sung, C. T., 2014, Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals, *Front Microbiol.*, 5, 241.
- Yegin, S., Fernandez-Lahore, M., 2012, Boza: A traditional cereal-based, fermented Turkish beverage, In: Hui, Y. H., Evranuz, O.E. (Eds.), *Handbook of Plant-based Fermented Food and Beverage Technology*, Boca Raton, U.S.: CRC Press, pp. 533–542.
- Yeung, P. S. M., Cano, R., Tong, P. S., Sanders, M. E., 1999, Comparison of API, 16S rDNA sequencing and fatty acid analysis as methods to speciate commercial probiotic bacteria, *J. Dairy Sci.*, 82 (6).
- Yilmaz-Ersan, L., Turan, M. A., 2012, Major and minor element concentrations in fermented shalgam beverage, *International Journal of Food Properties*, 15, 903–911.
- Yuksekdag, Z. N., Beyatli, Y., Aslim, B., 2004, Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic, *LWT—Food Science and Technology*, 37, 663–667.
- Zacharof, M. P., Coss, G. M., Mandale, S. J., Lovitt, R. W., 2013, Separation of lactobacilli bacteriocins from fermented broths using membranes, *Process Biochemistry*, 48, 1252–1261.

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Oluwaseun Temitope ALADEBOYEJE
Doğum Yeri	Owo, Nijerya
Doğum Tarihi	20.08.1991
Uyruğu	☐ T.C. ☒ Diğer: NİJERYA
Telefon	05394175840
E-Posta Adresi	oluwaseunaladeboyeje@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	University of Ilorin, Nijerya
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Mikrobiyoloji
Mezuniyet Yılı	31.07.2014

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji
Programı	Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji

Doktora	
Üniversite	
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Anabilim Dalı Adı
Programı	Program Adı

Makale ve Bildiriler	
Oluwaseun Aladeboyeje, Alhassan Sani, 2014, Microbiological Assessment of commercial Yoghurt Drinks retailed in Ilorin Metropolis, North-Central Nigeria, The Undergraduate Library, 2014.	