



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GENETİK KARAKTERİZASYONU YAPILMIŞ ÇEŞİTLİ LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BAZI ÖZELİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Edibe Rabia ÖZKAN

DOKTORA TEZİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Mart-2021
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Edibe Rabia ÖZKAN

16.03.2021

ÖZET

DOKTORA TEZİ

GENETİK KARAKTERİZASYONU YAPILMIŞ ÇEŞİTLİ LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BAZI ÖZELİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Edibe Rabia ÖZKAN

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nihat AKIN

2021, 124 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Nihat AKIN
Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ
Prof. Dr. Cemalettin SARIÇOBAN
Doç. Dr. Sultan ARSLAN TONTUL
Dr. Öğr. Üy. Durmuş SERT

Bu çalışmada geleneksel Tulum peynirinden izole edilen 11 adet *Lactobacillus* spp., 10 adet *Enterococcus* spp. ve 8 adet *Streptococcus* spp.'ye ait suşlar gelişme özellikleri (farklı sıcaklıklarda gelişme, farklı alkol, NaCl ve H_2O_2 konsantrasyonlarında gelişme, dondurma ve liyofilizasyona dayanıklılık), stres tolerans kabiliyeti (lizozim, safra, asit, mide ve pankreas özsu toleransı), adezyon yeteneği (hidrofobisite ve otoagregasyon), fonksiyonel özellikler (antibakteriyal aktivite, bakteriyosin üretimi, diasetil üretimi, β-galaktosidaz aktivitesi, kolesterol asimilasyonu, ekzopolisakkarit üretimi) ve güvenlik özellikleri (hemolitik aktivite, antibiyotik direnci, biyojen amin üretimi ve virülans gen) açısından incelenmiştir.

Tüm izolatların lizozim varlığında 2 saat inkübasyon sonundaki canlılıkları % 50'nin üzerinde tespit edilmiş olup izolatlar % 1 oranında safra varlığında da canlılıklarını koruyabildiği tespit edilmiştir. pH 3'te tüm *Lactobacillus* izolatları ile birlikte 4 *Enterococcus* (277, 894, 702 ve 394) ve 4 *Streptococcus* (1046, 932, 120 ve 1214) izolatı canlı kalabilirken pH 2'de sadece 8 (665, 16, 184, 15, 449, 24, 480 ve 675) laktobasil izolatı canlı olarak tespit edilmiştir. Pepsin içeren ortamda tüm laktobasil izolatları, 99, 277, 894, 702, 1041, 394, 1078 no'lu enterokok izolatları ve 930 no'lu streptokok izolatı %50'nin üzerinde bir oranda canlılığını korumuştur. Bununla birlikte izolatların üzerinde pankreatinin önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

15, 449, 24 no'lu laktobasil, 99, 1041, 394, 1078, 1050 no'lu enterokok, 1046, 930, 937 ve 1191 no'lu streptokok izolatlarının n-hekzadekan ve ksilene karşı hidrofobisite yetenekleri %40'ın üzerinde belirlenmiş ve tüm LAB izolatlarının 3 ve 24 saat sonundaki otoagregasyon oranları sırasıyla %7.44-43.19 ve %2.53-53.87 aralığında tespit edilmiştir.

Salmonella Typhimurium ATCC 14028'e karşı hiçbir izolat antibakteriyal etki göstermemiş olup 16, 184 ve 375 dışındaki tüm izolatların *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'a karşı antibakteriyal zon oluşturduğu gözlemlenmiştir. *Listeria monocytogenes* ATCC 7644'e karşı 10 izolat (laktobasillerde 15 ve 449; enterokoklarda 277, 894, 702, 1041 ve 394; streptokoklarda 1046, 932 ve 375), *Bacillus cereus* ATCC 11778'e karşı 2 izolat (120 ve 930 no'lu streptokok) ve *Escherichia coli* ATCC 25922'e karşı sadece 1 izolat (675 no'lu streptokok) antibakteriyal etki oluşturmuştur. İlgili suşların antibakteriyal etkilerinin bakteriyosin kaynaklı olmadığı belirlenmiştir. LAB suşları arasında sadece 1030 (181.87 MU), 1270 (132.57 MU), 24 (120.17 MU) ve 480 (177.93 MU) no'lu laktobasil izolatlarının yüksek β-galaktosidaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. En yüksek kolesterol asimilasyon değerleri laktobasillerde 184 (%53.67), 1030 (%49.44), 15 (%43.79), 16 (%41.90), 288 (%41.90), 665 (%41.43)

no'lu izolatlarda, enterokoklarda ise 675 (%0.49), 99 (%50.85) ve 12 (%48.49) no'lu izolatlarda belirlenmiştir. İncelen bütün izolatların EPS ürettiği belirlenmiştir.

Güvenlik açısından incelenen LAB izolatlarının hepsi γ-hemolitik aktivite göstermiş olup lisin, tirozin ve ornitin içeren besiyerlerinde biyojen amin üretimi gerçekleşmezken arjinin dekarboksilasyon aktivitesi sadece 665, 1030, 1270, 15 no'lu laktobasil, 277, 1041, 394, 1050 no'lu enterokok, 120 ve 937 no'lu streptokok suşlarında belirlenmiştir. En yaygın kullanılan penisilin antibiyotiğine karşı 24, 937 ve 1214 dışında hiçbir izolat direnç göstermemektedir. 99, 394 ve 894 no'lu enterokok izolatları virülans gen varlığı açısından incelenmiş olup 99 no'lu izolat hiç virülans gen içermezken izolat 894'te 3 (*gel*E, *cyl*A ve *asa*1) 394'te ise 5 (*gel*E, *cyl*A, *cyl*$L_{l,S}$, *cyl*M, *hyl*$_{efm}$) virülans gen belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre *Lb. plantarum* izolat 15, *Ent. faecium* izolat 99, *Ent. faecium* izolat 894 ve *S. infantarius* 930 no'lu suşların yüksek probiotik özellik gösterdiği ve ileri *in vivo* çalışmalar için iyi birer probiyotik aday olabilecekleri düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: doğal LAB, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, probiyotik.

ABSTRACT

Ph.D THESIS

DETERMINATION OF SOME CHARACTERISTICS OF VARIOUS GENETICALLY CHARACTERIZED LACTIC ACID BACTERIA

Edibe Rabia ÖZKAN

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES OF SELCUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY IN FOOD ENGINEERING

Advisor: Prof. Dr. Nihat AKIN

2021, 124 Pages

Jury
Prof. Dr. Nihat AKIN
Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ
Prof. Dr. Cemalettin SARIÇOBAN
Assoc. Prof. Dr. Sultan ARSLAN TONTUL
Assist. Prof. Dr. Durmuş SERT

In this study; eleven *Lactobacillus* (*Lb.*), ten *Enterococcus* (*Ent.*) and eight *Streptococcus* (*S.*) strains isolated from traditional Turkish Tulum cheeses were characterized regarding their growth properties (growth at different temperature, growth at different alcohol, NaCl and H_2O_2 concentrations and resistance to freezing and lyophilization), stress tolerance ability (lysozyme tolerance, bile and acid tolerance, gastric and pancreatic juices tolerance), adhesion ability (hydrophobicity and auto-aggregation), functional properties (antibacterial activity, bacteriocin and diacetyl production, β-galactosidase activity, production of exopolysaccharides, and cholesterol removal), and safety properties (hemolytic activity, antibiotic resistance, biogenic amine production, and virulence gene).

The viability of all isolates was determined above 50% after 2 hours in the presence of lysozyme and all isolated strains survived, even in the presence of 1% bile after 48 h. At pH 3, all lactobacilli isolates, 4 enterococci (277, 894, 702 and 394), and 4 streptococci (1046, 932, 120 and 1214) isolates survived, while at pH 2 only 8 lactobacilli isolates (665, 16, 184, 15, 449, 24, 480 and 675) survived. All the *Lactobacillus* isolates, *Enterococcus* isolates 99,277, 894, 702, 1041, 394, 1078 and *Streptococcus* isolate 930 kept their viability (over 50%) after the treatment with simulated gastric juice. All the lactic acid bacteria strains exhibited good survival at simulated pancreatic juice.

The highest cell hydrophobicity rates towards both n-hexadecane and xylene were observed for isolates 15, 449, 24, 99, 1041, 394, 1078, 1050, 1046, 930, 937 and 1191, while the auto-aggregation values of the isolates ranged from 7.44 to 43.19% and 2.53 to 53.87% at 3 and 24 h, respectively.

None of the isolate showed antibacterial effect against *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, while all the lactic acid strains except isolates 16, 184 and 375 expressed a clear inhibition zone against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. A total of 10 isolates (15, 449, 277, 894, 702, 1041, 394, 1046, 932, 375), 2 isolates (120 and 930), and 1 isolate selectively provided antibacterial effect against *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Bacillus cereus* ATCC 11778, and *Escherichia coli* ATCC 25922, respectively, and these antibacterial effects were not found to be caused by bacteriocin action. Among the LAB strains, 1030 (181.87 MU), 1270 (132.57 MU), 24 (120.17 MU) and 480 (177.93 MU) indicated the presence of β-galactosidase activity. The highest cholesterol assimilation values were observed for isolates 184 (53.67%), 1030 (49.44%), 15 (43.79%), 16 (41.90%), 288 (41.90%), 665 (41.43%), 675 (40.49%), 99 (50.85%), and 12 (%48.49). All the isolates exhibited EPS production ability.

Whole the LAB isolates examined for safety showed γ-hemolytic activity. None of the LAB strains tested could decarboxylase lysine, tyrosine, or ornithine, and only ten strains (665, 1030, 1270, 15,

277, 1041, 394, 1050, 120 and 937) produced agmatine from arginine. All the LAB isolates except isolate 24, 937, and 1214 were found to be sensitive or intermediate sensitive to penicillin, which is a frequently used antibiotic. Isolates 99, 394 and 894 were examined based on the presence of virulence genes encoding for aggregation substance (asa1), cytolysin (CylLL, CylLs, CylM, CylB, CylA), gelatinase (gelE), and hyaluronidase (hylefm) and no virulence gene was detected for isolate 99. Isolate 894 harbored three virulence determinants including asa1, gelE and CylA, while isolate 394 harbored five virulence determinants including gelE, CylA, *cyl*$L_{l,S}$, *cyl*M, *hyl*$_{efm}$.

According to the results obtained, *Lb. plantarum* isolate 15, *Ent. faecium* isolate 99, *Ent. faecium* isolate 894, and *S. infantarius* isolate 930 were shown to be a potential candidate for further *in vivo* investigations as a probiotic culture.

Keywords: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, probiotic, wild LAB.

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın planlanması ve yürütülmesinde bana yol gösteren ve her daim desteğini hissettiğim değerli danışman hocam Prof. Dr. Nihat AKIN'a;

Bu süreçte gösterdikleri destek ve yardımlardan dolayı Tez İzleme Komitesi üyeleri değerli hocalarım Prof. Dr. Cemalettin SARIÇOBAN ve Dr. Öğretim Üyesi Durmuş SERT'e

Laboratuvar çalışmaları sırasında yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Talha DEMİRCİ'ye, Dr. Öğretim Üyesi Hale İnci ÖZTÜRK'e, Arş. Gör. Dr. Hümeyra ÇETİN BABAOĞLU'na, Öğr. Gör. Dr. Aysun Oraç'a, Öğr. Gör. Dr. Çiğdem KONAK GÖKTEPE'ye, Arş. Gör. Didem SÖZERİ ATİK'e, Gıda Yüksek Mühendisi Sümeyye DEMİRCİ'ye, Gıda Yüksek Mühendisi Nussiba ALSİDDİG BEDAWİ'ye, Gıda Yüksek Mühendisi Gizem ÇAM'a, Gıda Mühendisi Merve GÜLAÇAN, Meryem Kübra SATILMIŞ ve Merve ÇALMAZ'a;

Bu çalışmanın yürütülmesinde 18201166 no'lu proje ile maddi destek sağlayan ve burs imkanı sunan Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne;

Çalışmamın her aşamasında her türlü fedakarlığı gösteren anne ve babama, her konuda destek olan kardeşlerime ve her daim yüzümü güldüren minik yeğenlerim Zeynep Rana, Hatice Hüma, Mustafa Uğur ve Fatıma Meva'ya

Sonsuz teşekkür ederim.

Edibe Rabia ÖZKAN
KONYA-2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **vi**

ÖNSÖZ ..... **viii**

İÇİNDEKİLER ..... **ix**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **xi**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **4**

2.1. Probiyotik Laktik Asit Bakterileri 4
2.2. Probiyotik Seçimi 7
2.2.1. Stres tolerans kabiliyeti 9
2.2.2. Adhezyon kabiliyeti 11
2.2.3. Antimikrobiyal aktivite 13
2.2.4. Fonksiyonel özellikler 14
2.2.5. Güvenlik kriterleri 18
2.2.5.1. Antibiyotik direnci 18
2.2.5.2. Hemolitik aktivite ve biyojen amin oluşumu 20
2.2.5.3. Virülans Faktörleri 21

3. MATERYAL VE YÖNTEM **26**

3.1. Materyal 26
3.1.1. Laktik Asit Bakteri Seçimi 26
3.1.2. Kültür Koşulları 26
3.2. Analiz Yöntemleri 27
3.2.1. Laktik asit bakterilerinin farklı ortam şartlarında gelişme özelliklerinin saptanmasında kullanılacak analiz yöntemleri 27
3.2.1.1. Farklı sıcaklıklarda gelişme 27
3.2.1.2. Farklı alkol konsantrasyonlarında gelişme 27
3.2.1.3. Farklı NaCl konsantrasyonlarında gelişme 27
3.2.1.4. Farklı H_2O_2 konsantrasyonlarında gelişme 28
3.2.1.5. Dondurma ve liyofilizasyona dayanıklılık 28
3.2.2. Laktik asit bakterilerinin probiyotik özelliklerinin saptanmasında kullanılan analiz yöntemleri 29
3.2.2.1. Lizozim toleransı 29
3.2.2.2. Safra tuzuna dayanıklılık 29
3.2.2.3. Asit toleransı 30
3.2.2.4. Mide özsuyuna ve pankreas özsuyuna dayanıklılık 30
3.2.2.5. Hidrofobisite 31
3.2.2.6. Otoagregasyon 32
3.2.2.7. Antibakteriyal aktivite 32
3.2.2.8. Bakteriyosin üretimi 32
3.2.2.9. Diasetil üretimi 33

3.2.2.10. β-galaktosidaz aktivitesi 34
3.2.2.11. Kolesterol asimilasyonu 35
3.2.2.12. Ekzopolisakkarit (EPS) üretimi 35
3.2.2.13. Antibiyotik direnci 37
3.2.2.14. Hemolitik aktivite 37
3.2.2.15. Biyojen amin üretimi 38
3.2.2.16. Virülans gen tespiti 38
3.2.3. İstatistiki analiz 39

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 40

4.1. Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanmasına Ait Sonuçlar ve Tartışma 40
4.2. Laktik Asit Bakterilerinin Farklı Ortam Şartlarında Gelişme Özelliklerine Ait Sonuçlar ve Tartışma 42
4.3. Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Özelliklerine Ait Sonuçlar ve Tartışma .. 47
4.3.1. Lizozim toleransı sonuçları ve tartışma 47
4.3.2. Safra ve asit toleransı sonuçları ve tartışma 50
4.3.3. Mide ve pankreas özsuyuna dayanıklılık sonuçları ve tartışma 54
4.3.4. Hidrofobisite ve otoagregasyon sonuçları ve tartışma 58
4.3.5. Antibakteriyal aktivite sonuçları ve tartışma 61
4.3.6. Bakeriyosin üretimi sonuçları ve tartışma 67
4.3.7. Diasetil üretimi sonuçları ve tartışma 67
4.3.8. β-galaktosidaz aktivitesi sonuçları ve tartışma 69
4.3.9. Kolesterol asimilasyonu sonuçları ve tartışma 70
4.3.10. Ekzopolisakkarit üretimi sonuçları ve tartışma 72
4.3.11. Antibiyotik direnci sonuçları ve tartışma 74
4.3.12. Hemolitik aktivite sonuçları ve tartışma 78
4.3.13. Biyojen amin üretimi sonuçları ve tartışma 79
4.3.14. Virülans gen tespiti sonuçları ve tartışma 81

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 85

5.1. Sonuçlar 85
5.2. Öneriler 92

KAYNAKLAR 93

EKLER 110

ÖZGEÇMİŞ 123

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

µL	:	Mikrolitre
µm	:	Mikrometre
°C	:	Santigrat derece
$CaCl_2$	:	Kalsiyum klorür
Da	:	Dalton
dk	:	Dakika
g	:	Gram
g	:	Dakida dönüş hızı
H_2SO_4	:	Sülfirik asit
HCl	:	Hidroklorik asit
KCl	:	Potasyum klorür
KH_2PO_4	:	Potasyum dihidrojen fosfat
KOH	:	Potasyum hidroksit
L	:	Litre
M	:	Molar
mg	:	Miligram
$MgSO_4.7H_2O$	:	Magnezyum sülfat heptahidrat
mL	:	Mililitre
mm	:	Milimetre
N	:	Normal
Na	:	Sodyum
Na_2CO_3	:	Sodyum karbonat
$Na_2HPO_4.2H_2O$	:	Di-sodyum hidrojen fosfat dihidrat
NaCl	:	Sodyum klorür
$NaH_2PO_4.2H_2O$	:	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat
$NaH_2PO_4.7H_2O$	:	Sodyum dihidrojen fosfat heptahidrat
$NaHCO_3$	:	Sodyum bikarbonat
NaOH	:	Sodyum hidroksit
nm	:	Nanometre
s	:	Saat
sn	:	Saniye
α	:	Alfa
β	:	Beta
γ	:	Gama
H_2O_2	:	Hidrojen peroksit

Kısaltmalar

AM	:	Amfisilin
B.	:	*Bacillus*
BA	:	Biyojen amin
bç	:	Baz çifti
BHI	:	Brain Heart Infusion
BLAST	:	Basic local alignment search tool(s)
C	:	Kloramfenikol
CN	:	Gentamisin
DNA	:	Deoksiribo nükleik asit
E	:	Eritromisin
E.	:	*Eschericha*
EFSA	:	Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu
Ent.	:	*Enterococcus*
EPS	:	Ekzopolisakkarit
FAO	:	Gıda ve Tarım Örgütü
FTS	:	Fosfat tampon solüsyonu
GI	:	Gastrointestinal
GRAS	:	Genel olarak güvenli kabul edilen (Generally Recognized as Safe)
K	:	Kanamisin
kob	:	Koloni oluşturan birim
L.	:	*Listeria*
LAB	:	Laktik asit bakterisi
Lb.	:	*Lactobacillus*
MRS	:	de Man Rogosa Sharpe
MU	:	Miller unit
NCBI	:	National Center for Biotechnology Information
OD	:	Optik yoğunluk
onpg	:	o-nitrofenil-β-D-galaktozit
P	:	Penisilin
PCR	:	Polymerase chain reaction
QPS	:	Nitelikli Güvenlik Varsayımı (Qualified Presumption of Safety)
RNA	:	Ribo nükleik asit
rpm	:	Dakika devir sayısı (revolutions per minute)
S	:	Streptomisin
S.	:	*Streptococcus*
Salm.	:	*Salmonella*
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat
spp	:	Türler
Staph.	:	*Staphylococcus*
subsp	:	Alt türler
TCA	:	Triklorasetik asit
TE	:	Tetrasiklin
VA	:	Vankomisin
WHO	:	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

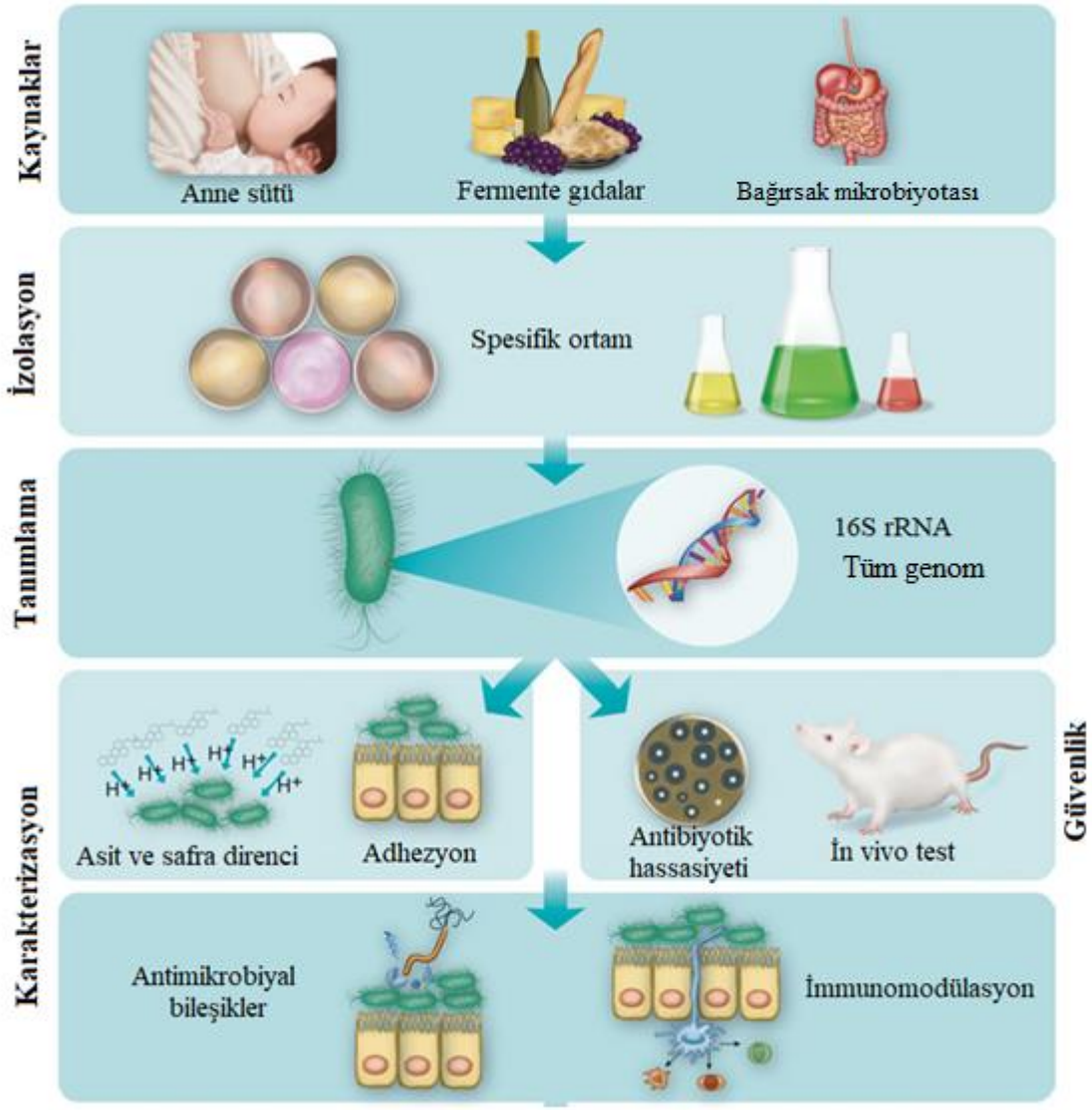
Fermente süt ürünlerinde, uzun güvenli bir kullanım geçmişinin olması ve insan sağlığı üzerindeki yararlı etkilerinin bilinmesi, probiyotiklere olan ilgi ve talebi arttırmıştır (Liong, 2011). Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ne göre probiyotikler "yeterli miktarlarda alındığında konakçı sağlığına faydalı olan canlı mikroorganizmalardır". Özellikle gastrointestinal mikrobiyotanın sırasıyla predominant ve subdominant grupları olan *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* suşları en yaygın kullanılan probiyotik bakterilerdir (Guarner ve Malagelada, 2003). Bunlar birçok fonksiyonel gıda ve gıda takviyesinde yer almaktadır (Gourbeyre ve ark., 2011).

Probiyotik bir mikroorganizmanın sağlığa faydalı etkilerinin görülebilmesi için aşağıdaki kriterleri karşılaması gerekmektedir.

- Konakçı sağlığı üzerinde kanıtlanmış faydalı bir etkiye sahip olmalıdır.
- Patojenik, toksik ve önemli bir olumsuz etkiye sahip olmamalıdır.
- Gastrointestinal geçiş sırasında canlı kalabilmelidir (*in vivo* ve *in vitro*)
- Sağlık üzerinde yararlı olabilmesi için üründe yeterli sayıda canlı hücre bulunmalıdır.
- İstenilen özelliklerinin korunması için ürün matrisi, işleme ve depolama koşulları ile uyumlu olmalı ve doğru etiketlenmelidir.

İnsan çalışmaları ve hayvan modellerinden elde edilen kanıta dayalı analiz sonuçları, probiyotiklerin birçok hastalık üzerindeki potansiyel klinik etkinliğini göstermektedir (Yan ve Polk, 2011). Aslında, probiyotiklerin ishali baskıladığı, laktoz intoleransını ve ameliyat sonrası komplikasyonları azalttığı, antimikrobiyal ve anti-kolorektal kanser aktiviteleri sergilediği, huzursuz bağırsak semptomlarını azalttığı ve inflamatuvar bağırsak hastalığını (sindirim sisteminde, özellikle bağırsaklarda, iltihap içeren rahatsızlık) önlediği belirtilmektedir. Ancak, probiyotiklerin sağlık üzerindeki potansiyel faydalarına ilişkin genellemeler yapılmamalıdır. Çünkü probiyotik etkiler suşa özgü olma eğilimindedir. Bu nedenle, bir suşa atfedilen fayda, aynı tür içinde başka bir suş için geçerli olmayabilir (Williams, 2010; Fontana ve ark., 2013).

Probiyotik hedef fonksiyon aralığı ve teknolojik uygulamalar nedeniyle, yeni probiyotik adayların seçimi ve değerlendirilmesi, birden fazla adımı içeren kapsamlı bir yaklaşım gerektirmektedir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1: Bir bakteri türünün yeni bir probiyotik olarak nitelendirilmesi için izlenecek akış şeması (Fontana ve ark., 2013)

2002'den önce, probiyotik mikroorganizmaların etkinliğini ve güvenliğini onaylayan uluslararası bir düzenleme bulunmamaktadır. Bu nedenle, FAO/WHO, probiyotikler için güvenlik ve etki standartlarını belirleyen "Gıdalarda Probiyotiklerin Değerlendirilmesine Yönelik Kılavuzlar" yayınlamıştır (Araya ve ark., 2002). Bu kılavuzda, insan vücudunun dayattığı olumsuz koşullara direnç, epitel hücreye adhezyon kabiliyeti, antimikrobiyal aktivite ve güvenlik değerlendirmesi dahil olmak üzere, probiyotiklerin seçimi için çeşitli kriterler önerilmektedir. Mikroorganizmaların,

insanların sağlığı ve refahı ile bütünleşik yönlerle ilişkisini gösteren kanıtlar, probiyotiklerin seçimi için yeni stratejiler üretmiştir. Bunlar, antikarsinojenik, antidepresan, anti-obezite, anti-diyabetik ve kolesterol düşürücü aktiviteler gibi probiyotiklerin biyolojik özelliklerini ve ayrıca virülans, toksisite ve transfer edilebilir antibiyotik direnç genine ilişkin güvenlik hususlarını değerlendirme yöntemlerini içermektedir (de Melo Pereira ve ark., 2018).

Halen gıda sanayiinde kullanılan laktik asit bakteri kültürlerinin hemen hemen tamamının yurt dışından ithal ediliyor olması, kendi geleneksel ürünlerimizden izole edilen laktik asit bakterilerinin de çoğunlukla atıl vaziyette kalması, teknolojik ve fonksiyonel özelliklerinin saptanıp gıda endüstrisinin kullanımına sunulamaması gözlemlenen eksiklikler arasındadır. Yapılan bu tez çalışması ile; çeşitli laktik asit bakteri koleksiyonu içerisinde endüstride kullanılabilecek kültürler olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada Orta Toroslar Yöresinde geleneksel metotlarla üretilen deri tulum peynirlerinden izole edilen ve moleküler tanımlaması yapılan laktik asit bakteri koleksiyonundan *Lactobacillus, Enterococcus* ve *Streptococcus* türlerini içeren 29 adet suş seçilmiş ve seçilen bu suşların bazı gelişme ve probiyotik özellikleri değerlendirilmiştir. Gelişme özellikleri bakımından farklı sıcaklıklarda gelişme, farklı alkol, NaCl ve H_2O_2 konsantrasyonlarında gelişme, dondurma ve liyofilizasyona dayanıklılık analizleri; probiyotik özellikleri bakımından lizozim toleransı, safra ve asit toleransı, mide ve pankreas özsuyuna dayanıklılık, hidrofobisite, otoagregasyon, antibakteriyal aktivite, bakteriyosin üretimi, diasetil üretimi, β-galaktozidaz aktivitesi, kolesterol asimilasyonu, ekzopolisakkarit üretimi, antibiyotik direnci, hemolitik aktivite, biyojen amin üretimi ve virülans gen tespiti analizlerine tabi tutulmuştur. Bu çalışmadan elde edilen veriler bahsi geçen suşların endüstriyel uygulamalarda kullanım potansiyellerine ilişkin ışık tutmaktadır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Probiyotik Laktik Asit Bakterileri

Probiyotikler, intestinal sistemin mikrobiyel dengesini düzenleyerek konakçı sağlığı üzerinde yararlı etkileri olan canlı mikrobiyel gıda katkılarıdır. Probiyotik tanımı, insan ve hayvan sağlığını güçlendiren ve gıda, yem veya gıda katkı maddelerine ilave edilen mikrobiyel preparatların tümünü içine almaktadır (Uymaz, 2009). Bilinen probiyotik mikroorganizmalar arasında, laktik asit bakteri (LAB) türlerinin (örneğin, *Lactococcus* (*Lc.*), *Lactobacillus* (*Lb.*), *Streptococcus* (*S.*) ve *Enterococcus* (*Ent.*)) ve *Bifidobacterium*'un uzun bir güvenli kullanım geçmişi vardır (Soccol ve ark., 2014; Doron ve Snydman, 2015; Prado ve ark., 2015). Bu mikrobial gruplar insan vücudunun elverişsiz koşullarına (ör. tükürük enzimleri, düşük pH, safra ve pankreas özsuyu) direnme, bağırsak epitel hücrelerine kolonize olma ve mikropları düzenleyerek ve biyolojik fonksiyonları yerine getirerek konakçı sağlığına katkıda bulunma kabiliyetine sahiptir (Marchesi ve ark., 2016; de Melo Pereira ve ark., 2018). Her ne kadar dünya çapında ticari probiyotik fermente gıdalarda çeşitli fonksiyonel LAB kullanılsa da, biyofonksiyonel ürün pazarı, mevcut ürünlerin uygulanmasına ve çeşitlendirilmesine sürekli ihtiyaç duymaktadır. Bu amaçla, farklı ve spesifik fonksiyonel özelliklere sahip yeni suşların seçimini konu alan çok sayıda bilimsel çalışma yürütülmektedir. Yeni mikrobiyal gruplar (örneğin, maya ve *Bacillus*) ve daha spesifik LAB suşları sürekli olarak tanımlanmaktadır. Bu yeni mikroorganizmalar, ürün geliştirme için güvenli bir izolasyon kaynağı olarak kabul edildiğinden genellikle insanlardan izole edilmektedir. Bununla birlikte, şu anda süt ürünleri, meyveler, tahıllar ve atıklar gibi yeni izolasyon kaynakları kullanılmaktadır (Sornplang ve Piyadeatsoontorn, 2016).

Laktik asit bakterileri, özellikle süt bazlı fermente gıdaların üretiminde geleneksel starter kültür olarak kullanılmaktadır. LAB'lar süt ve diğer gıdalarda arzu edilen fermantatif değişiklikler meydana getirerek sindirimi iyileştirmek için eski zamanlardan beri insan beslenmesinde yer almaktadır. LAB'ların çoğu, güvenli kullanım geçmişlerine dayanarak gıda sınıfı organizma olarak sınıflandırılmaktadır (de Souza Leone ve ark., 2017). Çeşitli çalışmalar LAB'ların balık, et, tahıl, meyve, sebze, baklagil ve süt ürünlerinden izole edildiğini ortaya koymuştur. Bu durum LAB'ların, bu gıda maddeleri ile düzenli olarak beslenen kişilerin normal mikroflorasının bir parçası

olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, bu bakterilerin çoğu insan bağırsak yolunun yaygın komensallidir ve ürogenital sistem, ağız boşluğu gibi insan vücudunun diğer bölgelerinde de bulunmaktadır. Bifidobakteriler ve laktobasiller, sağlıklı insanlarda normal GI sistem mikrobiyotasının ana gruplarını oluşturmaktadır (Ruiz-Moyano ve ark., 2012). LAB'ların insanlarda uzun süreli güvenli kullanımı özellikle *Lactococcus* ve *Lactobacillus* olmak üzere çoğu LAB suşunun "GRAS" (Genel olarak güvenli kabul edilen) olarak sınıflandırılmasına neden olmuştur (Floch, 2013). Buna ek olarak, Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu (EFSA), güvenlik değerlendirme kriterlerine dayanarak birçok *Lactobacillus* türüne "QPS" (Nitelikli Güvenlik Varsayımı) statüsü vermiştir (Ricci ve ark., 2017). EFSA tarafından QPS statüsü verilern *Lactobacillus* türleri *Lb. acidophilus, Lb. amylolyticus, Lb. amylovorus, Lb. animalis, Lb. alimentarius, Lb. aviaries, Lb. brevis, Lb. buchneri, Lb. casei, Lb. cellobiosus, Lb. collinoides, Lb. coryniformis, Lb. crispatus, Lb. curvatus, Lb. delbrueckii, Lb. diolivorans, Lb. farciminis, Lb. fermentum, Lb. gallinarum, Lb. gasseri, Lb. helveticus, Lb. hilgardii, Lb. johnsonii, Lb. kefiranofaciens, Lb. kefiri, Lb. mukoza, Lb. panis, Lb. paracasei, Lb. paraplantarum, Lb. pentosus, Lb. plantarum, Lb. pontis, Lb. reuteri. , Lb. rhamnosus, Lb. sakei, Lb. salivarius,* ve *Lb. sanfranciscensis*'dir. EFSA paneli ayrıca, *Lb. rhamnosus*'un bazı suşları hariç, bugüne kadar açıklanan *Lactobacillus* türlerinin çoğunun insanlar için patojenik olmadığı sonucuna varmıştır. Güvenli kullanım geçmişine rağmen, yeni suşlar sürekli olarak geliştiği ve ticarileştirildiği için probiyotiklerin güvenliği çok önemlidir. Bu nedenle, her yeni probiyotik suşunun, güvenlik açısından değerlendirilmesi gerekmektedir (Pradhan ve ark., 2020).

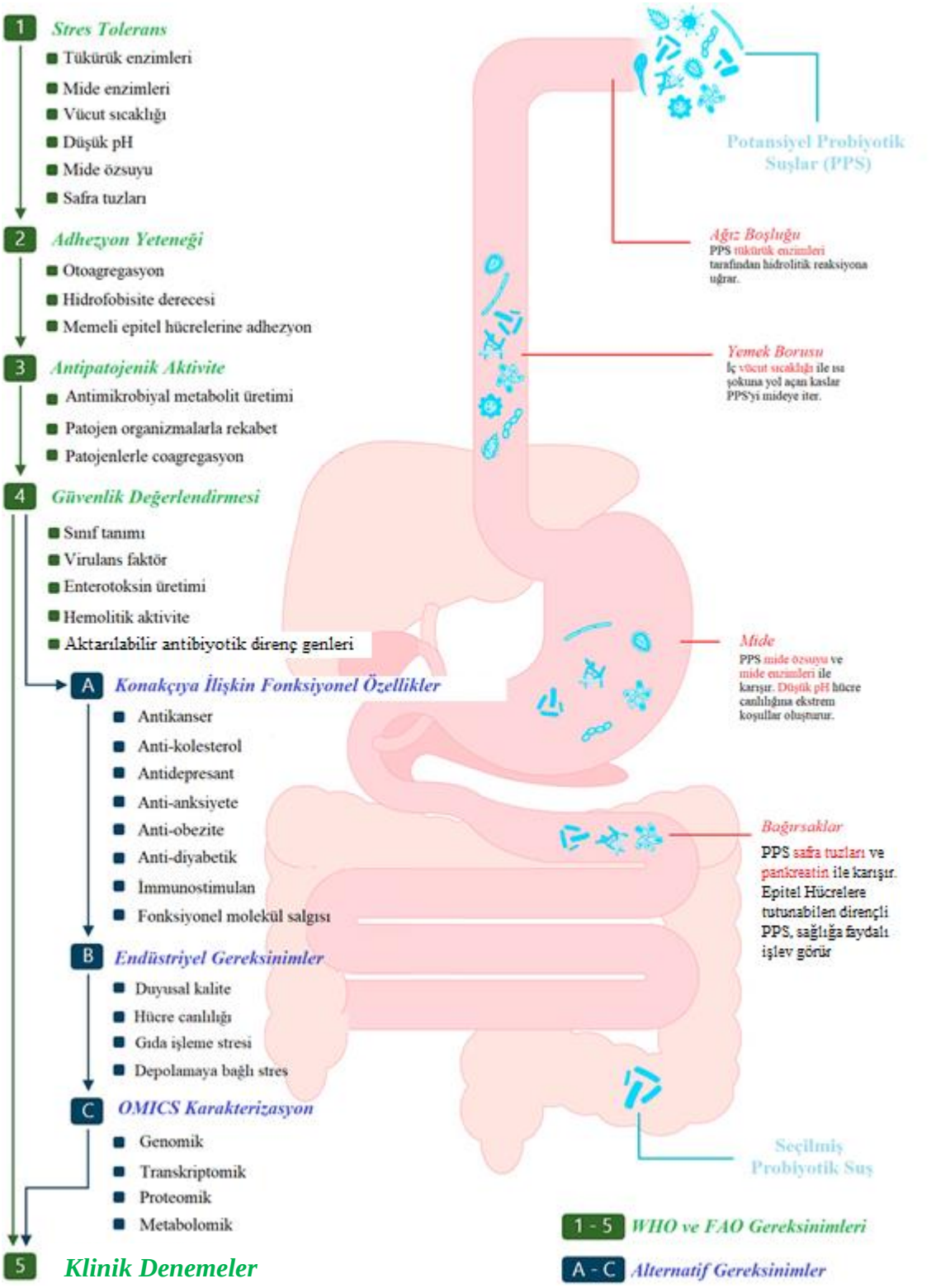
Enterokoklar, insanların ve hayvanların GI sisteminin doğal bir üyesi olarak bulunmaktadır. Bu bakteriler doğada her yerde bulunmakta ve gıda endüstrisinde probiyotik olarak (Franz ve ark., 2003) veya yüksek tuz içeriğine ve düşük pH'ya sahip peynir üretiminde starter kültür olarak kullanılmaktadır (Wessels ve ark., 1990). Geleneksel Akdeniz peynirlerinin karakteristik tadına katkı sağlamakta ve sosis, zeytin gibi diğer fermente gıdalarda ve sebzelerde bulunmaktadır. Gıda kaynaklı patojenlerin ve bozulmaya yol açan bakterilerin gelişmesini engelleme potansiyeline sahip enterosin gibi bakteriyosinler ve antimikrobiyel peptidler ürettiklerinden dolayı gıdaların korunması için bazı enterokok suşları önerilmiştir (Khan ve ark., 2010; Franz ve ark., 2011). Son zamanlarda, bakteriyosinler, yararlı mikroorganizmaların seçiminde yeni bir probiyotik özellik olarak önerilmiştir. Bazı enterokok suşları, aynı anda birkaç

bakteriyosin üretir ve bu da kolonizasyon ve hücre kontrolü için diğer mikroorganizmalara karşı rekabet avantajı sağlamaktadır (Hanchi ve ark., 2018). *Enterococcus* spp. birçok suş içermesine rağmen, probiyotik olarak *Ent. faecalis, Ent. faecium, Ent. lactis* ve son zamanlarda *Ent. hirae* (Adnan ve ark., 2017) ve *Ent. durans* gibi sadece birkaç suş üzerinde çalışılmıştır (Li ve ark., 2018). Örneğin, Cylactins (Hoffmann-La Roche, Basel, İsviçre), Fargo 688s (Quest International, Naarden, Hollanda), ECOFLOR (Walthers Health Care, DenHaag, Hollanda) veya Symbioflor 1 (SymbioPharm, Herborn, Almanya) olarak pazarlanan bazı *Enterococcus* suşları huzursuz bağırsak sendromu ve tekrarlayan kronik sinüzit veya bronşit semptomlarını hafifletmek için terapötik tedavilerde kullanılmaktadır (Franz ve ark., 2003; Moreno ve ark., 2006). Öte yandan, bazı enterokokların fırsatçı patojenler olduğu ve nozokomiyal enfeksiyonların yaygın bir nedeni olduğu bilinmektedir. Bu bakteriler, bakteriyemi, endokardit, idrar yolu enfeksiyonları veya diğer enfeksiyonlarda rol oynamaktadır. Son zamanlarda, *Ent. faecalis*'in pankreas ve kolorektal kanserlerdeki rolü ortaya atılmakta olup bu konu ile ilgili tartışmalar devam etmektedir (de Almeida ve ark., 2018; Maekawa ve ark., 2018). *Ent. faecalis*'in patojenitesine katkıda bulunan bir faktörde, birçok suşun geniş bir antibiyotik yelpazesine karşı direnç göstermesidir (Franz ve ark., 2003). Bu antibiyotik direnci, kromozom üzerinde bulunan kendine özgü ve/veya sonradan kazanılan genlerden veya plazmit ve transpozonlar gibi hareketli elementlerden kaynaklanır. Vankomisine dirençli enterokoklar, insanlarda görülen klinik enfeksiyonların tedavisinde büyük sorunlar ortaya çıkarmaktadır, çünkü bu ilaç birden çok antibiyotiğe dirençli enterokoklar için son tedavi çaresi olarak kullanılmaktadır (Ogier ve Serror, 2008). Ayrıca, vankomisin direnç geninin *Ent. faecalis*'ten metisiline dirençli *Staphylococcus* (*Staph.*) *aureus* gibi diğer patojenlere aktarıldığı bildirilmiştir (Palmer ve ark., 2010). Virülans faktörler ayrıca nozokomiyal enfeksiyonlarda enterokokların uygunluğuna ve kalıcılığına katkıda bulunur. *Ent. faecalis*'te bulunabilen virülans faktörler arasından bazıları (asa1, gele, ace, esp ve cylA) süt ürünleri izolatlarında belirli aralıklarda tespit edilmiştir (Popović ve ark., 2018). Bu nedenlerden dolayı, *Enterococcus* türleri GRAS durumuna veya QPS listesi gereksinimlerine sahip değildir ve gıda veya ilaç endüstrisine yeni potansiyel probiyotik suş olarak önerilmesi için aktarılabilir antibiyotik direnç genlerinin ve/veya potansiyel virülans faktörlerinin bulunup bulunmadığı her bir suş için araştırılmalıdır (Ricci ve ark., 2017).

Genetik, fizyoloji, biyokimya ve uygulamalar bakımından farklılık gösteren çeşitli türleri içeren *Streptococcus* spp. kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. *S. bovis* gibi streptokok türlerinin patojenik özellikleri belirlenmiş ve bakteriyemi ve kolon kanseri ile ilişkilendirilmiştir (Corredoira ve ark., 2008). *S. gallolyticus* varlığı bulaşıcı hastalıklar ve hatta bazı GI/kolorektal kanser tiplerinin yüksek gelişme riski ile ilişkilendirilmiştir. Birçok *Streptococcus* spp. patojen olarak tanımlanmış ve farklı klinik vakalar ile ilişkilendirilmiş olsa bile bu cinsin en popüler temsilcisi olan *S. thermophilus* GRAS olarak kabul edilmiştir (Dos Santos ve ark., 2020). LAB'ların bir üyesi olan *S. thermophilus*, termofilik bakteri grubu olarak tanımlanmakta olup çok sayıda süt ürününde starter kültür olarak kullanılmaktadır. *S. thermophilus, Lc. lactis*'ten sonra endüstriyel LAB'ların en önemli ikinci türü olarak kabul edilmektedir (Iyer ve ark., 2010). *S. thermophilus* suşlarının incelendiği çalışmada antikanserojen etki ile birlikte *in vitro* probiyotik özellikler gösterdikleri ve bazı durumlarda ticari probiyotik olan *Lb. rhamnosus* GG'den daha iyi etkilere sahip oldukları bildirilmiştir (Tarrah ve ark., 2018). Bu suşların teknolojik özellikleri göz önüne alındığında probiyotik starter kültür olarak kullanılarak hem gıda endüstrisi hem de insan sağlığı açısından avantaj sağlanabileceği ileri sürülmektedir. *S. thermophilus*'a ilişkin ayrıntılı genom çalışmaları, bu suşun ekolojik habitat koşullarının özgünlüğü ve süt ortamına adaptasyonu ile ilgili genomunun önemli bir kısmını kaybettiğini göstermiştir. Süt ortamlarından izole edilmiş, mikroevrimsel değişiklikler ve spesifik çevresel koşullara adaptasyon gösteren *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* için de benzer bulgular bildirilmiştir (Leuschner ve ark., 2010). Ayrıca fermente süt ürünlerinden izole edilen *S. gallolyticus* subsp *macedonicus* suşlarının güvenli olduğu gösterilmiş ve hatta bazı suşlar için faydalı özellikler önerilmiştir (De Vuyst ve Tsakalidou, 2008; Pieterse ve ark., 2010). Laiño ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada B9 vitamini (folat) üreticisi *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* CRL415 suşunun, süt endüstrisinde fonksiyonel bir starter kültür olarak kullanılabileceğini belirtmiştir.

2.2. Probiyotik Seçimi

Probiyotik mikroorganizmaların seçimi, Şekil 2.1'de gösterilene benzer bir strateji kullanarak sistematik bir yaklaşım gerektirmektedir. Çoğu durumda, çok sayıda izole edilmiş suş, probiyotik adayların sayısını aşamalı olarak azaltmak için birçok testten oluşan bir prosedürü kullanma ihtiyacına yol açmaktadır.



Şekil 2.1: WHO/FAO ve Maragkoudakis ve ark. (2006), Prescott ve Björkstén (2007), Chang ve ark. (2010), Ooi ve Liong (2010), Divya ve ark. (2012), Vidhyasagar ve Jeevaratnam (2013), Persichetti ve ark. (2014), Luna ve Foster (2015), Fiorda ve ark. (2016)'nın çalışmalarına göre probiyotik suşların karakterizasyonu için kullanılan tarama yaklaşımları (de Melo Pereira ve ark., 2018).

Bu prosedürün sonunda, en fazla sayıda fonksiyonel özellik sergileyen ve eşzamanlı olarak herhangi bir olumsuz özellik taşımayan suşlar seçilmektedir.

2.2.1. Stres tolerans kabiliyeti

İlk olarak, aday suşlar, insan vücudunun uyguladığı stres koşullarıyla başa çıkmak için değerlendirilmektedir. Uygulama sırasında probiyotik mikroorganizma, amilaz ve lizozim gibi ağız boşluğunda bulunan enzimlere karşı dirençli olmalıdır. Gram pozitif bakteriler genellikle lizozime duyarlı olmasına rağmen, bazı LAB'lar diğer gram pozitif bakterilere göre daha dirençlidir ve insanların ağız boşluğunun yerleşik mikrobiyomunun bir parçası olabilirler (Gilliland, 1979; Fuller, 1992; Kõll-Klais ve ark., 2005). Tüketildikten sonra, probiyotik hücreler midede (düşük pH, mide özsuyu ve pepsin) ve bağırsaklarda (pankreatin ve safra tuzları) antimikrobiyal faktörlerin yanı sıra iç vücut sıcaklığının neden olduğu hafif ısı şokuyla karşı karşıyadır (Şekil 2.1) (Dunne ve ark., 2001; de Melo Pereira ve ark., 2018).

Probiyotik mikroorganizma, bağırsakta hayatta kalabilmek için asit ve safra toleransına sahip olmalıdır. Safra tuzları, lipofilik bileşiklerin sindirimini kolaylaştırmakla birlikte aynı zamanda bağırsak mikrobiyotasının oluşumunu doğrudan etkileyerek bir antimikrobiyal ajan olarak davranmaktadır. İnsan safrasının ilgili fizyolojik konsantrasyonları % 0.3-0.5 arasında değişmektedir (Zavaglia ve ark., 1998; Dunne ve ark., 2001). Probiyotikler asit ve safra tuzlarına karşı oldukça değişken bir direnç göstermekte ve bu özellik hem türe hem de suşa bağlı olarak değişmektedir. Örneğin laktobasiller geniş ölçüde dirençliyken bifidobakteriler düşük pH'a karşı son derece duyarlıdır, pH 2 ve pH 3'te hayatta kalma oranları düşüktür veya hiç yoktur (Fontana ve ark., 2013). 29 adet *Lactobacillus* suşunu değerlendiren Maragkoudakis ve ark. (2006), sadece altı suşun pH 1'de bir saat hayatta kalabildiğini ve sekiz suşun pH'sı 2 olan pepsin çözeltisinde canlılığını koruyamadığını belirtmiştir. Benzer bir sonuç Lim ve ark. (2004) tarafından bildirilmiştir; bu çalışmada *Streptococcus, Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* dahil olmak üzere 100 bakteri suşundan sadece 51'inin pH 2.5'ta hayatta kalabildiği belirtilmiştir. Özet olarak, 2-5 arasında değişen pH ve % 0.3-2 arasında safra tuzu konsantrasyonları, probiyotik mikroorganizmaların seçimi için kritik kabul edilmektedir (Psani ve Kotzekidou, 2006; Ogunremi ve ark., 2015). Bu direnç özellikleri, ilgili suşun, pepsin, lizozim ve amilaz gibi enzimlerin, fenol, NaCl, sığır

safrası, domuz mide özsuyu, pankreatik ve taurodeoksikolik asit varlığında farklı bir pH'da geliştirilmesiyle test edilebilmektedir. Bu bileşiklere karşı direnç, koloni sayımı veya farklı zaman aralıklarında absorbans ölçümü ile tespit edilebilmektedir (Maragkoudakis ve ark., 2006; Divya ve ark., 2012; de Melo Pereira ve ark., 2018)

Probiyotikler, ince bağırsağa ulaşıp konakçı hücreye kolonize olabilmeleri ve böylece fayda sağlamaları için asidik mide ortamında hayatta kalmalıdır. Türler ve suşlar arasında farklılıklar olsa da, organizmalar genellikle 3'ün altındaki pH değerlerinde artan duyarlılık sergilemektedir (Rönkä ve ark., 2003). Bu nedenle asit toleransı, potansiyel olarak probiyotik suşları seçmek için kullanılan arzu edilen özelliklerden biri olarak kabul edilir. Probiyotiklerin mide geçişi çalışmaları, hem simüle edilmiş mide suyu hem de hayvan ve insan mide suları kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Charteris ve ark., 1998; Gardiner ve ark., 1999). Bu yaklaşımların her ikisinde de sınırlamalar bulunmaktadır. Bunlardan ilki, mide salgılarının besinsel ve asidik olmayan bileşenlerinin probiyotiğin varlığını sürdürmesi üzerindeki etkisini tam olarak belirleyemeyebilir. İkincisi ise taze materyalin temin edilebilmesi ve kullanılabilirliği araştırmayı sınırlandırmaktadır (Charteris ve ark., 1998). Ek olarak, asitlendirilmiş MRS ortamı gibi zengin ortamın kullanılması, enerji ve metabolik öncüler sağlayarak bakterilere koruma sağlayabilir. GI geçişte probiyotik canlılığını korumak için gıda bileşenlerinin kullanımı kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (Charteris ve ark., 1998; Gardiner ve ark., 1999). Bununla birlikte, tek tek gıda bileşenlerinin etkilerini ve LAB'ların hayatta kalmasını artıran altta yatan etki mekanizmalarını açıklayan çok az veri mevcuttur (Charalampopoulos ve ark., 2003; Santos ve ark., 2015).

Laiño ve ark. (2019) *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* CRL415 suşunun probiyotik özelliklerini incelediği çalışmada bu suşun % 0.3 safra içeren ortamda % 57 canlılık gösterdiğini ancak % 1 safrada bu oranın % 30'un altında kaldığını belirtmiştir. Aynı suş % 0.6 pepsin içeren pH'sı 2 olan gastrik ortamda ve ardından pankreatik ortamda test edilmiş olup asit koşullarında hücre yoğunluğunda değişme olmazken pankreatik ortamda hücre yoğunluğunda yaklaşık 1 log kob/mL düşme meydana geldiği bildirilmiştir.

Santos ve ark. (2015) peynirden izole ettikeri ve probiyotik aday olabileceklerini düşündükleri *Ent. faecium* EM485 ve *Ent. faecium* EM925 suşlarını 1 saat simüle mide

ortamına, 3 saat simüle bağırsak ortamına maruz bırakmış ve sonrasında hücre sayılarında sırasıyla 3.98 ve 3.03 log kob/mL'lk azalma olduğunu belirtmiştir. Başlangıç hücre sayıları 8 log kob/mL olan suşların mide asidi koşullarında 1 saat sonraki hücre sayılarının 4-5 log kob/mL'ye düştüğünü bildirmişlerdir.

Feta-tip peynirden izole dilen *Lactobacillus* suşlarının probiyotik özelliklerinin incelendiği başka bir çalışmada Plessas ve ark. (2017) 10 adet laktobasil suşunun *in vitro* simüle GI geçiş testlerinde pepsin ve pankreatin dirençlerini araştırmış olup başlangıç sayıları 8.2-9 log kob/mL arasında değişen suşların pepsin içeren ve pH'sı 2 olan ortamda 2 saat sonraki hücre sayılarını 2.9-7 log kob/mL olarak belirlemiştir. Buna ilaveten suşların pankreatin içeren ve pH'sı 8 olan ortamda 4 saat sonraki hücre sayılarının 2.1-8.5 log kob/mL arasında olduğunu birdirmişlerdir. Aynı çalışmada pH 2 ve 3'teki asit toleransı sırasıyla % 70 ve % 88 olan *Lb. paracasei* K5 izolatının iyi bir probiyotik aday olabileceğini ve daha ileri *in vivo* ve *in vitro* testler gerektirdiğini belirtmişlerdir.

Son olarak Ben Braïek ve ark. (2018) enterosin üreten 2 adet *Ent. lactis* suşunu 5 dk lizozim 90 dk pepsin ve 150 dk boyunca pankreatin içeren ortama maruz bırakmıştır. Çalışmada simüle sindirim sistemine girişte 8.90 ve 8.98 log kob/mL olan hücre sayısını muamele sonrasında sırasıyla 8.82 ve 8.95 log kob/mL olarak hesaplamış ve iki suşunda *in vitro* stres koşullarına oldukça dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

2.2.2. Adhezyon kabiliyeti

Bir sonraki adım, potansiyel probiyotik adaylarının gastrointestinal kanal epitel hücrelerine kolonize olup olamayacağını değerlendirmektir. Epitel hücrelere mikrobiyal adhezyon, probiyotik suş hücre yüzeyinin kimyasal ve fizyokimyasal bileşimine bağlı olan iki membranı (yani mikrobiyal ve insan hücreleri) içeren karmaşık bir temas prosesidir. Bu davranış, hedef yüzeydeki elektrostatik ve Van der Waals etkileşimlerinin dengesine bağlıdır, ancak çalışmalar bakteriyel ekstraselüler bileşenlerin ve çevresindeki bileşimin adhezyonu etkileyebileceğini ileri sürmüştür (Boonaert ve Rouxhet, 2000; Duary ve ark., 2011). Mikroorganizmaların epitel hücrelere adhezyonu, hücre yüzeyinin hem otoagregasyon kapasitesi hem de hidrofobik özellikleri ile ilgilidir. Mikrobiyal hücre otoagregasyon yeteneği, probiyotiğin,

adhezyon mekanizmasına katkıda bulunan bağırsaktaki yüksek hücre yoğunluğuna ulaşmasını sağlarken, hücre yüzeyi hidrofobikliği mikroorganizma ve insan epitel hücreleri arasında gelişmiş bir etkileşime izin verir. Otoagregasyon, fosfat tampon solüsyonu (FTS) ile bir suş süspansiyonunun absorbansının çeşitli zaman aralıklarında ölçüldüğü basit bir yöntemle tespit edilebilmektedir. Hücre yüzeyi hidrofobikliği MATH yöntemi ile ölçülebilmektedir. Yöntem, su, bir hidrokarbon ve bir suş süspansiyonunun karıştırılmasından oluşmaktadır. İki fazlı çözelti karıştırılmakta ve suşun hidrofobikliği, 600 nm'de absorbans ölçümü ile tespit edilmektedir. Caco-2, HT-29, fetal I-407 gibi memeli epitel hücrelerine doğrudan adhezyon kapasitesi, mikrobiyal adhezyon özelliğini değerlendirmenin başka bir yoludur (Fontana ve ark., 2013; Leite ve ark., 2015; de Melo Pereira ve ark., 2018).

García-Hernández ve ark. (2016) probiyotik aday seçmenin önemli bir kriterinin, sindirim sisteminde daha uzun süre kalıcılığın yanı sıra bağışıklık sisteminin daha iyi modüle etmek için bir ön koşul olan bağırsak mukozal hücrelerine yapışma kabiliyeti (yüksek yüzey hidrofobisitesi ile ilişkili) olduğunu ve hidrofobisite değeri % 50'nin üzerinde olan suşların hidrofobik olarak değerlendirilebileceğini belirtmişlerdir. Çalışmalarında inceledikleri 9 laktik asit bakterisinden sadece *Lb. pentosus* LB-31 suşunun % 71.10 ile yüksek hidrofobik özellik sergilediğini ortaya koymuşlardır. Öte yandan Zago ve ark. (2011) incelediği *Lb. plantarum* suşlarının hidrofobisite değerlerini 2.19-30.83 aralığında tespit etmiş olup çalışmada kullandıkları ticari probiyotik *Lb. plantarum* LMG2911 ve ATCC14917 suşlarının hidrofobisite değerlerini sırasıyla % 13.81 ve 13.53 olarak vermiştir.

Otoagregasyon ve koagregasyon yeteneği, probiyotik mikroorganizmaların iki önemli özelliğidir (Campana ve ark., 2017). Otoagregasyonun epitel hücrelere adhezyon ile ilişkili olduğu (Collado ve ark., 2008), koagregasyonun ise patojenik mikroorganizmaların kolonizasyonu için koruyucu bir bariyer oluşturduğu bilinmektedir (Kos ve ark., 2003; Abushelaibi ve ark., 2017). Ayrıca, gastrointestinal sistemdeki bakteriyel denge, insan bağırsağındaki probiyotiklerin agregasyonu ile artmakta olup LAB'ların probiyotik özellikleri, bağırsak patojenleri ile koagregasyon yetenekleri sayesinde gelişmektedir (Nami ve ark., 2019). Patojenler ile LAB'ların koagregasyonundan dolayı savunma bariyerinin oluşması, patojenlerin insan bağırsağında kolonize olmasına engel olmaktadır (Vidhyasagar ve Jeevaratnam, 2013).

Nami ve ark. (2019) LAB'ların koagregasyon yeteneğinin inkübasyon süresi ve suştan önemli ölçüde etkilendiğini göstermiştir. Shekh ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada LAB'ların otoagregasyon yeteneğinin zamana bağlı olarak artış gösterdiğini ve 2, 4 ve 24 saat sonraki otoagregasyon değerlerinin sırasıyla % 1-19, % 5-46 ve % 33-92 aralığında tespit edildiğini bildirmiştir.

2.2.3. Antimikrobiyal aktivite

Bağırsağa tutunduktan sonra probiyotikler karbonhidratların, proteinlerin ve diğer minör bileşiklerin organik asit, enzim, hidrojen peroksit, bakteriyosin ve düşük molekül ağırlıklı peptitler gibi önemli maddelere dönüştürülmesiyle ekstraselüler antimikrobiyal bileşenler üretmektedir (de Melo Pereira ve ark., 2018). Patojen bakterilerin mukozal yüzeylere adhezyonu ve bağırsak mikrobiyotasının bozulması, bağırsak enfeksiyonlarına yol açmaktadır. Probiyotik bakteriler, mukozal yüzeylere adhezyon ve kolonizasyon yoluyla korumakta ve, besin maddeleri ve bağışıklık uyarımı için patojenlerle etkin bir şekilde rekabet edebilmektedirler (Fontana ve ark., 2013). Bu antagonist aktiviteler, mikrobiyal suşlara göre değişmektedir (Verón ve ark., 2017).

Probiyotik suşların sıvı besiyerinde ve agar plaklarında patojenlerin gelişmesini inhibe etme ve hücre hattında sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin üretimini modüle etme yetenekleri, biyolojik etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılan *in vitro* modeller ile belgelenmiştir. Antimikrobiyal metabolit üretimi, inhibisyon zonu analizi ile agar plaklarında değerlendirilebilirken (Cueva ve ark., 2010; Divya ve ark., 2012), fareler ve diğer hayvan modelleri de probiyotiklerin *in vivo* antimikrobiyal aktivitesini incelemek için faydalıdır (Fontana ve ark., 2013).

Boricha ve ark. (2019) insan ve gıda kaynaklı *Lactobacillus* türlerinin patojen ve gıdalarda bozulmaya yol açan mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel etkinliklerini incelemiştir. Yaptıkları çalışmada tüm izolatların hem Gram negatif bağırsak patojenlerine karşı hem de Gram pozitif gıda kökenli patojenlere karşı antimikrobiyel aktivite gösterdiklerini ve LAB'ların patojenleri inhibisyon derecelerinin patojen türüne göre değiştiğini ve suşa özgü olduğunu ortaya koymuşlardır.

Rajoka ve ark. (2018) kümes hayvanları bağırsağından izole ettikleri laktik asit bakterilerinin *Staphylococcus petrasii* subsp. *pragensis* KY196531, *Salmonella enteric*

sv. *typhimurium* CMCC (B) 50115 ve *E.coli* ATCC 25922'ye karşı antibakteriyal aktivitelerine bakmış olup tüm izolatların 3 patojene karşı 6-14 mm arasında inhibisyon zonu oluşturduğunu ve *E. coli* ve *Staphylococcus*'a karşı antibakteriyal aktivitelerinin *Salmonella*'ya göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Deve sütünden izole edilen 9 laktik asit bakterisinden 6 tanesinin *L. monocytogenes* ATCC 7644, *Salm. typhimurium* 02-8423, *E. coli* O157: H7 1934 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 15923'e karşı güçlü antibakteriyal aktivite sergilediği ve diğer patojenlere kıyasla *Staph. aureus*'a karşı izolatların daha fazla etki gösterdiği bildirilmiştir (Abushelaibi ve ark., 2017).

Zago ve ark. (2011) peynirden izole ettikleri *Lb. plantarum* suşlarının *E. coli* V517, *Salm. enteritidis* OMS-Ca, *L. monocytogenes* ATCC 15313 ve *Staph. aureus* 76 patojen bakterilere karşı antagonistik etkilerine bakmış ancak izolatların hiçbirinin patojenlere karşı inhibisyon zonu oluşturmadığını belirtmiştir.

2.2.4. Fonksiyonel özellikler

Ekzopolisakkaritler (EPS), mikroorganizmalar tarafından sentezlenerek hücre dışına salgılanan polisakkaritler olup laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS'lerin bağışıklık sistemini geliştirici, kolesterolü düşürücü, antiülser ve antitümör etkisinin olduğu belirtilmiştir (Soyuçok ve ark., 2016). Eksopolisakkaritler yapısal olarak iki gruba ayrılmaktadır. Yapısında sadece tek tip monosakkarit içeren polimerler, homopolisakkarit; iki veya daha fazla monosakkarit türü içeren polimerler ise heteropolisakkarit olarak adlandırılmaktadır (Duboc ve Mollet, 2001). LAB'lar tarafından üretilen eksopolisakkaritler diğer polisakkaritler gibi viskozite arttırıcı, stabilizatör ve jel oluşturma özelliklerine sahip olduğundan dolayı farklı gıdaların üretiminde rol alarak, gıdalara arzu edilen özellikleri kazandırmaktadırlar (Yıldız, 2013). Öte yandan EPS üretimi probiyotiklerin bağırsak yüzeyine kolonize olup canlılığını devam ettirebilmesini sağlayan önemli bir özelliktir (Mozzi ve ark., 2006). Mikroorganizmalar tarafından üretilen EPS, bağırsak epitel dokusu ile bağırsak mikroflorasında bulunan bakteriler arasında bir bağ oluşturduğundan dolayı EPS üretebilen suşlar epitele yüksek kapasitede yapışma özelliğine sahiptirler (Böke, 2005; Şahin, 2012).

Keçi sütünden izole edilen 50 LAB'ı değerlendiren de Almeida Júnior ve ark. (2015) izolatların 10-100 mg/L arasında EPS ürettiğini, ortalama EPS üretim miktarının 27.60 mg/L olduğunu ve 50 izolattan 21'inin ortalamanın üzerinde üretim gerçekleştirdiğini ortaya koymuştur. Öte yandan Georgalaki ve ark. (2000) Kasseri peynirinden izole ettikleri *S. macedonicus* suşlarının biyokimyasal özelliklerini incelemiş olup suşların hiçbirinde EPS üretimine rastlamamıştır. Deve sütünden izole edilen laktik asit bakterilerinin yoğurt üretiminde kullanılabilirliğini araştıran Fguiri ve ark. (2017) 10 izolatın 7'sinde EPS üretiminin olduğunu ve EPS üretebilen suşların yoğurt üretiminde kullanılması durumunda son ürünün tekstürünü olumlu etkileyeceğini belirtmiştir. Son olarak anne sütünden izole edilen *Lb. rhamnosus* suşlarının probiyotik etkisini inceleyen Rajoka ve ark. (2017) çalışmada kullandıkları tüm izolatların MRS agar üzerinde yapışkan görüntü sergilediklerini ve bunun EPS üretimi ile ilişkili olduğunu belirtmiştir.

Purutoğlu (2018) geleneksel kefir danelerinden izole ettiği *Lactobacillus, Lactococcus, Enterococcus* ve *Acetobacter* spp. suşlarının EPS üretim karakteristiklerini incelemiş ve EPS üretim miktarlarını 0.15-0.60 g/L aralığında tespit etmiştir. Yapılan tez çalışmasında LAB tarafından üretilen toplam EPS miktarının, EPS genlerinin ekspresyon seviyesi gibi iç faktörlere ve çoğunlukla ortam bileşimi (karbon ve nitrojen kaynakları) ve kültürel koşullar (sıcaklık, pH ve inkübasyon süresi) gibi dış faktörlere bağlı olduğu ve EPS üretim miktarlarının türler arasında hatta suş bazında değişkenlik gösterebildiği belirtilmiştir.

İspirli (2016) Erzincan Tulum peynirinde bulunan laktik asit bakterilerinin EPS üretim potansiyelleri üzerine yaptığı tez çalışmasında, *eps* genlerinin tespit edildiği *Lb. plantarum* DP1, *Lb. paracasei* DP3, *Lb. crustorum* DP11, *Lb. brevis* DP40, *Lb. plantarum* TP44, *Weissella paramesenteroides* TP49 ve *Lc. garvieae* TP110 izolatlarını %3 laktoz içeren MRS ortamında 37 °C'de aerobik şartlarda geliştirmiş ve bu türlerden EPS izolasyonu gerçekleştirerek EPS üretim miktarlarını 1694.615-1858.462 $\mu g/10^7$ kob aralığında bulmuştur.

Mikroorganizmaların sütteki laktozu fermente etme yeteneği, süt endüstrisinde potansiyel uygulamalara sahip LAB'ların önemli bir teknolojik özelliğidir. Süt ve süt türevlerine tat, doku ve besin değeri kazandıran laktozun hidrolizinde rol alan β-D-galaktosidaz ve/veya fosfo-β-D-galaktosidaz enzimleri bakteri, maya ve küf gibi çeşitli

organizmalarda belirlenmiştir (Zárate ve Chaia, 2012). Teknolojik önemlerinin yanı sıra, hem saf enzimler hem de onları içeren canlı mikroorganizmalar, laktoz intoleransı gibi bağırsak rahatsızlıklarını hafifletmek için kullanılmıştır. Bu durum yetişkin popülasyon arasında dünya çapında görülmektedir. Laktozun intra-intestinal hidrolizi ve kolon mikrobiyotasının modülasyonu için β-galaktosidaz kaynağı olarak mikroorganizmaların, özellikle laktobasil ve/veya bifidobakterilerin süt ürünlerine dahil edilmesiyle tedavi edilmiştir (Zárate ve Chaia, 2012). Bu anlamda, β-galaktosidaz aktivitesi, süt endüstrisindeki uygulamalarda probiyotikler veya LAB'lar için faydalı bir özelliktir (Santos ve ark., 2015). Ertekin (2007) tez çalışmasında farklı gıdalardan izole ettiği laktik asit bakterileri arasından *Lb. plantarum* ve *Pediococcus pentosaceus* izolatlarının β-galaktosidaz aktivite gösterme açısından probiyotik starter kültür için aranılan değerlere sahip olduğunu bildirmiştir. Turşu ve zeytinden elde edilen izolatların probiyotik değerini ortaya koymak için yapılan tez çalışmasında Karasu (2006), incelediği 16 adet *Lactobacillus* izolatınn 10'unda β-galaktosidaz aktivitesi tespit etmiş olup 3 izolatta zayıf aktivite olduğunu 2 izolatta aktivite olmadığını belirtmiştir.

Kolesterol vücut dokuları için önemli bir temel blok olmasına rağmen, yüksek kan kolesterolü koroner kalp hastalıkları için bilinen önemli bir risk faktörüdür (Aloğlu ve Öner, 2006). Yüksek kolesterole sahip hastalarda kalp krizi riski, normal kan lipid profiline sahip olanlara göre üç kat daha fazladır. Bu nedenle, serum kolesterolünün düşürülmesi, kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde oldukça önemlidir. HDL-kolesterolün, kan dolaşımından kolesterolü uzaklaştırarak arteriosklerozu (damar sertleşmesi) önlediği, LDL-kolesterolün ise damarlarda kolesterol biriktirerek arteryosklerozu hızlandırdığı bilinmektedir (Lim ve ark., 2004). Kan kolesterol seviyesini düşürmek için kulanılan yöntemler beslenme yönetimi, düzenli egzersiz ve ilaç tedavisini içermektedir (Dunn-Emke ve ark., 2001). Yüksek kolesterolün tedavisi için kolesterol seviyelerini etkili bir şekilde düşüren farmakolojik ajanlar mevcuttur. Ancak bu tür ajanların ciddi yan etkilere sahip oldukları bilinmektedir (Kumar ve ark., 2012). İnsan bağırsağında doğal olarak bulunan mikroorganizmalar serum kolesterolünün düşürülmesinde faydalıdır. LAB'lar, özellikle *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* spp. kolesterolü metabolize etme yeteneğine sahiptir. Son bulgular probiyotiklerin serum kolesterol seviyelerini düşürerek kalp hastalıklarının önlenmesinde faydalı olduğunu desteklemektedir (Lim ve ark., 2004). Probiyotikler, kolesterolün çözünürlüğünü düşürerek bağırsaktan emilimini azaltmaktadır (Nguyen ve

ark., 2007). Kolesterol düşürücü suşların seçimi kolesterol ile zenginleştirilmiş sıvı besiyerleri kullanılan *in vitro* testlerle gerçekleştirilebilmektedir. Probiyotik süspansiyon bu besiyeri ile muamele edilmekte ve kalan kolesterol miktarı, o-fitalaldehit yöntemi kullanılarak ölçülmektedir (Pereira ve Gibson, 2002). Probiyotiklerin kolesterol düşürücü etkisi, insan bağırsağındaki safra asitlerinin enzimatik dekonjugasyon mekanizmasına dayanmaktadır. Probiyotikler tarafından üretilen BSH enzimleri, konjuge safra tuzlarını dekonjuge safra tuzlarına dönüştürür ve dekonjüge safra tuzları dışkıyla daha kolay atılır (Nguyen ve ark., 2007). Safra asitlerinin bir öncüsü olan kolesterol, dışkı yoluyla kaybedilenlerin yerine safra tuzlarına dönüştürülerek serum kolesterolünde düşme meydana gelir (Kumar ve ark., 2012). Aday probiyotiklerin BSH aktivitesi, agar plaka analizi veya PCR metodu ile belirlenebilmektedir (de Melo Pereira ve ark., 2018). Kolesterol düşürücü suşları seçmek için yapılan *in vivo* çalışmalar, probiyotik alımını takiben kan, idrar ve dışkı gibi örneklerde kolesterolü tespit ederek de gerçekleştirilebilir (Ding ve ark., 2017; de Melo Pereira ve ark., 2018).

Usman (1999) tarafından, *Lb. gasseri* suşları kullanılarak yapılan bir çalışmada, 28 suşun tamamının kolesterolü bağlama yeteneğine sahip olduğu, ancak kolesterol bağlama kabiliyetinin suşlara bağlı olarak değişiklik gösterdiği ortaya konmuştur. Bu farklılığın, bakteri hücre duvarındaki peptidoglikanların kimyasal ve yapısal farklılığı ile ilgili olabileceği öne sürülmüştür. Okuklu (2014) Urla bölgesindeki geleneksel yoğurt starter kültürlerinin probiyotik özelliklerini incelemiş olup yaptığı çalışmada kolesterol ilave edilmiş MRS ortamında test edilen basil suşlarının % 19-54 aralığında; kok suşlarının ise % 44-50 aralığında kolosterol asimile etme yeteneğine sahip olduğunu bildirmiştir.

Ayyash ve ark. (2018) deve sütünden izole ettiği *Enterococcus* ve *Streptococcus* suşlarının kolesterol asimilasyon değerlerini % 35.4-43.1 arasında belirlemiş olup diğer suşlara göre yüksek asimilasyon yeteneğine sahip *S. equinus* KX881778 izolatının insan sağlığına fayda sağlayacak fonksiyonel gıdaların üretiminde kullanılması için iyi bir aday olabileceğini bildirmiştir. Geleneksel süt ürünlerinden izole edilen *Enterococcus*'ların probiyotik özelliklerini inceleyen Nami ve ark. (2019) suşların asimile ettiği kolesterol miktarını 99.93-216.45 µg/mL olarak tespit etmiş olup en

yüksek asimele etme oranının *Ent. durans*'a ait ES32, ES20 ve ES11 izolatlarına ait olduğunu belirtmiştir.

2.2.5. Güvenlik kriterleri

Canlı mikroorganizmaları diyete dahil ederken enfeksiyon riski değerlendirilmeli ve "probiyotiklerin güvenli olduğu" sonucu tam olarak dikkate alınmamalıdır (Culligan ve ark., 2009). Avrupa Topluluğu (Avrupa Birliği Yeni Gıda düzenlemesi, QPS ve PROSAFE), Amerika Birleşik Devletleri (FDA ve WHO) ve Kanada (Health Canada: NHPR) tarafından yapılan bazı girişimler, insan tüketimi için probiyotiklerin güvenlik değerlendirmesinde kriterler oluşturmaktadır. Yaygın öneriler arasında izolasyon geçmişi, taksonomik tanımlama ve virülans, enfektivite, toksisite ve aktarılabilir antibiyotik direnci genlerinin varlığı yer almaktadır (Sanders ve ark., 2010).

2.2.5.1. Antibiyotik direnci

Mikroorganizmaların güvenliğindeki temel kaygı antibiyotik direncidir. Probiyotik mikroorganizmalar, antibiyotik direnç genlerine sahip olmamalıdır. Antibiyotik direnç genleri, diğer bakterilere aktarılamadıkları sürece büyük bir endişe kaynağı değildir. Belirli bir antibiyotiğe direnç bir bakteri türüne veya cinse özgü (doğal direnç) olabilir ve bu durum organizmanın bir antimikrobiyal madde varlığında gelişmesine olanak sağlayabilir. Doğal direnç, kromozomda kodlanmıştır ve yatay olarak aktarılamaz. Bu durumda patojenik olmayan bakterilerde risk oluşturmaz. Buna karşılık, bir antibiyotiğe duyarlı olan bir türdeki bazı suşlarda kazanılmış direnç mevcuttur ve bakteriler arasında yatay olarak aktarılabilir. Antimikrobiyal maddelere karşı kazanılmış direnç, ya bakteri genomundaki mutasyonlardan ya da bir direnç mekanizmasını kodlayan plazmidler veya diğer mobil elementler aracılığıyla ek genlerin edinilmesinden kaynaklanabilir (Bernardeau ve ark., 2008).

Laktik asit bakterileri, düşman ortam oluşturan bir antibiyotik varlığında hayatta kalabilmek için genetik belirleyicileri değiştirmeye de eğilimlidir (Guarino ve ark., 2013). Bununla birlikte, probiyotik bakterilerde antibiyotik direncinin varlığıyla ilgili birincil endişe, bu direncin *in vivo* patojenik organizmalara aktarılma potansiyelidir. Ancak, birçok laktobasil türü, vankomisine doğal olarak dirençlidir. Ender görülen

enfeksiyon vakalarında probiyotiği tedavi edilemez hale getirmedikçe, bu doğal direnç kendi başına bir tehlike oluşturmaz. Laktobasiller genellikle hücre duvarını hedefleyen penisilin ve β-laktamaza duyarlıdır, ancak sefalosporinlere karşı daha dirençlidir. Öte yandan, laktobasiller genellikle kloramfenikol, makrolidler, linkozamidler ve tetrasiklin gibi birçok protein sentezi inhibitörünün düşük konsantrasyonlarına karşı hassastır. Kanamisin, gentamisin, streptomisin gibi aminoglikozidlere direnç genellikle yüksektir ve esas olarak ilaç alımına aracılık eden sitokrom aracılı elektron taşınmasının olmaması nedeniyle doğal direnç olarak kabul edilir (Hummel ve ark., 2007; Gueimonde ve ark., 2013). *Lactobacillus* spp'nin diğer antibiyotiklere karşı direnci suşlar arasında farklılık göstermektedir (Pradhan ve ark., 2020).

LAB suşlarının güvenlik değerlendirmesinde aktarılabilir antibiyotik direnç göstergelerinin varlığı, çok önemli bir parametredir çünkü aktarılabilir genetik elementler (plazmitler veya transpozonlar) üzerinde yer alan birkaç antibiyotiğe (örn. kloramfenikol, eritromisin, streptomisin, tetrasiklin ve vankomisin) direnç sağlayan genler laktobasillerde karakterize edilmiştir (Comunian ve ark., 2010). Geleneksel bir filtre eşleşme tekniği kullanılan *in vitro* eşleşme denemeleri, LAB'ların direnç belirleyicilerini diğer bakteri türlerine aktarabildiğini göstermiştir (Toomey ve ark., 2009). LAB ve kommensal bakteriler arasında antibiyotik direncinin *in vivo* transferi, gnotobiyotik rat (Jacobsen ve ark., 2007) ve farelerin (Feld ve ark., 2008) gastrointestinal sisteminde görülmüştür. Probiyotiklerin antibiyotik direnç faktörlerini aktarabileceği oldukça açıktır, bu nedenle bir probiyotik organizma insanlarda kullanılmadan önce ilgili risklerin dikkate alınması gerekir (Pradhan ve ark., 2020).

Dirençli suşları duyarlı suşlardan ayırt etmek için, "Hayvan Yeminde Kullanılan Katkı Maddeleri ve Ürünler Paneli (FEEDAP)" ilgili seçilmiş antibiyotiklere karşı LAB'ların birkaç cinsi için "mikrobiyolojik sınır değerleri" önermiştir (EFSA ve ark., 2018). FEEDAP tarafından mikrobiyolojik sınır değerlerinin tanımlanması için kullanılan veriler, yayınlanmış literatürden, Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesinden ve ayrıca Ulusal ve Avrupa izleme programlarından elde edilmiştir (EFSA ve ark., 2018). Ek olarak, mikro dizilim analizi ve çeşitli PCR teknikleri gibi moleküler yöntemlerin kullanımı, kazanılan direnç fenotiplerinin genetik temelini belirlemede son derece yardımcı olmaktadır. Dahası, genom sekanslarının artan kullanılabilirliği ve genom sekanslama araçlarının maliyetinin düşürülmesi,

antimikrobiyal direnç genlerinin ve transfer potansiyelinin taranması için yeni olanaklar sunmaktadır (Gueimonde ve ark., 2013).

2.2.5.2. Hemolitik aktivite ve biyojen amin oluşumu

Hemoliz, patojenler arasında yaygın bir virülans faktördür, mikroorganizmaların demire ulaşmasını kolaylaştırır ve konakçı hücrede anemi ve ödeme neden olur (Elli ve ark., 2000). Alfa (α) hemoliz, gerçek bir hemoliz olmayıp, hemoglobini yeşil methemoglobine oksitleyen ve bakteri kolonisine yeşil rengi veren, bakteri tarafından üretilen hidrojen peroksitten kaynaklanır. Öte yandan, beta (β) hemoliz kolonilerin etrafındaki ve altındaki ortamda bulunan kırmızı hücrelerin tam parçalanmasıdır ve alanın şeffaf görünmesini sağlar. Baumgartner ve ark. (1998), 15 gıda izolatı ve 5 klinik izolat dahil olmak üzere 53 adet *Lb. rhamnosus* suşunda koyun kanı üzerinde α-hemolitik aktivite tespit etmiştir. Benzer şekilde, Maragkoudakis ve ark. (2006) ve Pradhan ve ark. (2019) insan kanındaki laktobasillerde α-hemoliz fenotipi bildirmiştir. Bununla birlikte, çalışmaların çoğu *Lactobacillus* suşlarında β-hemoliz potansiyelinin olmadığını ancak α-hemolizin bulunabileceğini göstermiştir (Jampaphaeng ve ark., 2017). Ancak, Domingos-Lopes ve ark. (2017) tarafından yakın zamanda yapılan bir çalışmada, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*'nin iki suşunda (L3B21R1 ve L3B21R2) β-fenotip gözlemlenmiştir. Bu nedenle, insanlar tarafından tüketildiğinde kan hemoliz olasılığını ortadan kaldırmak için hemolitik potansiyel açısından yeni probiyotik suşların değerlendirilmesi gerekmektedir.

Biyojen amin (BA) oluşumu, laktik asit bakterilerinde endişe yaratan bir başka güvenlik parametresidir. Gıdalardaki biyojenik aminler, ortamda nitrat bulunduğunda kanserojen nitrozaminlerin potansiyel öncüleri olarak hareket edebildiklerinden, hem gıda bozulması hem de gıda güvenliği açısından büyük endişe kaynağıdır (Bover-Cid ve Holzapfel, 1999). Histamin ve tiramin, en toksik aminler arasındadır, bununla birlikte putresin ve kadaverin de kontamine gıdaların organoleptik özelliklerini tehlikeye atmaktadır. Bunlar, gıdalarda bulunabilecek belirli amino asitlerin dekarboksilasyonu ile oluşan düşük moleküler ağırlıklı azotlu bileşiklerdir. Yüksek biyojenik amin konsantrasyonlarına sahip gıdaların tüketimi baş ağrısı, bulantı veya kusma, kan basıncında değişiklik, kızarıklık gibi kendini gösteren zehirlenmelere neden olabilir (Ladero ve ark., 2010). BA, gıdada bulunan mikroorganizmaların substrata özgü

enzimleri aracılığıyla karşılık gelen amino asitlerin dekarboksilasyonu sonucu üretilir (ten Brink ve ark., 1990). BA oluşturma yeteneği, başlıca Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp., enterokoklar ve diğer LAB'lar olmak üzere çeşitli mikroorganizma grupları için tanımlanmıştır (Halász ve ark., 1994). Mikroorganizmalar tarafından BA üretimini belirlemek için çeşitli kalitatif ve kantitatif yöntemler tanımlanmıştır. Tarama prosedürlerinin çoğu genel olarak, bromokresol moru gibi bir pH indikatörü içeren diferansiyel bir ortamın kullanımını içerir. Genellikle ortam, öncü amino asitlerin eklendiği bir bazal bileşimden oluşur. Ortama ilave edilen amino asitlerden daha alkalin BA üretimi pH değişimine neden olur. İndikatörün pH değişimine yanıt olarak ortam rengini mora dönüştürmesiyle sonuç pozitif olarak değerlendirilir (Bover-Cid ve Holzapfel, 1999).

2.2.5.3. Virülans Faktörleri

Laktobasillerde patojenite ile ilişkili genler tanımlanmamış olsa da, sepsis raporları bulunmaktadır. Öte yandan, enterokoklarda (probiyotik olarak kullanılan bazı suşlar) hemolizin, jelatinaz vb. gibi çok sayıda virülans faktörü tanımlanmıştır. Bu nedenle, farklı araştırmacılar, *Lactobacillus* spp. gibi patojen olmayan bakterilerin kontrol edilmeleri için farklı virülans genleri önermişlerdir. Bununla birlikte, laktobasillerde virülans gen açısından bir fikir birliği olmamakla birlikte ek güvenlik önlemi olarak probiyotik bakterilerin virülans genleri açısından kontrol edilmesi önerilmektedir (Pradhan ve ark., 2020). Todorov ve ark. (2017) *L. plantarum* ST8Sh'de seks feromonları, agregasyon maddesi vb. gibi virülans genlerin varlığını bildirmiş, ancak bunlar güvenlik endişesi olarak değerlendirilmemiştir.

Enterokoklar bakteriyemi, endokardit, idrar yolu enfeksiyonları ve diğer enfeksiyonlara neden olan önemli nozokomiyal (hastane kaynaklı) patojenlerdir. Genellikle ciddi hastalığı olan veya bağışıklık yetersizliği olan kişilerde enfeksiyonlara neden olan fırsatçı patojenlerdir (Morrison ve ark., 1997). Patojeniteye katkıda bulunan ve dünya çapında endişelere yol açan faktörlerden biri, birçok suşun, genellikle çok az terapötik seçenek bırakan geniş bir antibiyotik yelpazesine direnç göstermesidir (Leclerc ve ark., 1996). Özellikle vankomisine dirençli enterokoklar hastanelerde küresel ölçekte sorunlara neden olmuştur (Werner ve ark., 2008; Franz ve ark., 2011).

Bununla birlikte, enterokokların virülansı, tek başına antibiyotik dirençleriyle açıklanamamaktadır. Suşların patojenitesinde rol oynayan virülans faktörler, konakçı dokuların kolonizasyonu ve istilası ile bağlantılı faktörlerin yanı sıra spesifik ve spesifik olmayan konakçı savunma mekanizmalarına karşı dirençlerini içermektedir. Dahası, bu tür virülant suşlar ya doğrudan toksin üretimi yoluyla ya da dolaylı olarak inflamasyon yoluyla patolojik değişiklikler üretmektedir (Johnson, 1994). *Enterococcus* spp. virülans faktörleri son birkaç yılda yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Bazı virülans faktörleri çok iyi tanımlanmışken, daha güç algılanan virülans belirleyiciler halen araştırılmaktadır. Şimdiye kadar tanımlanan virülans faktörler (Tablo 2.1) kolonizasyon, invazyon ve patolojik değişikliklerin üretimi gibi enterokokal enfeksiyonlar ile ilişkilidir.

Tablo 2.1: *Enterococcus* spp. virülans faktörleri (Chajęcka-Wierzchowska ve ark., 2017)

Virülans Faktörler	Gen	Fonksiyonu/Biyolojik Etki
Kolonizasyonu teşvik eden virülans faktörler		
-agregasyon maddesi (AS)	*agg*	Konakçı hücrelere bağlanma, konjugasyon için donör ve alıcı suşlar arasında hücreden hücreye temas sağlar
-kollajen bağlayıcı protein (Ace)	*ace*	Hücre dışı matris proteinlerine bağlanarak kolonizasyon
-hücre duvar adezini (Efa A)	*efaA*	Enfektif endokardit ile ilişkili virülans faktörler
-enterokokal yüzey proteini (Esp)	*esp*	Biyofilm üretimi
Dokuları etkileyen virülans faktörler		
-sitolizin (Cyl)	*ace*	Gram negatif bakterilere karşı bakterisidal özellikler ve eritrosit, lökosit, makrofajlara karşı toksik özellikler (β-hemoliz)
-jelatinaz (GelE)	*efa*A_{fs} *efa*A_{fm}	jelatin, elastin, kolajen, hemoglobinin yanı sıra diğer biyoaktif peptitleri hidrolize eder, örn. feromonlara bağlı proteinler
-hiyaluronidaz (Hyl)	*esp*	Bağ doku ve kıkırdak mukopolisakkaritlerinin yok edilmesinde rol oynar

2.2.5.3.1. Kolonizasyonu teşvik eden virülans faktörler

Enterokoklar, konakçı hücrelerin dokularına yapışabilir (Tomita ve Ike, 2004). Bu özellikleriyle birlikte düşük pH ve yüksek safra konsantrasyonlarına dirençleri enterokokların kolonda kolonize olan en yaygın bakteriler olmasına yardımcı olmaktadır (Moreno ve ark., 2006). Adezinleri (mikroorganizmaların konakçı hücreye tutunmasını kolaylaştıran madde), mukoza zarı üzerindeki reseptörlere veya hücre dışı matris proteinlerine bağlanmalarını sağlar, bu da epitelyumun kolonizasyonunu

kolaylaştırır (Franz ve ark., 2003). Kolonize olmazlarsa bağırsak hareketiyle atılırlar. Kolonizasyon kendi başına patojenitenin kanıtı değildir, ancak diğer virülans faktörler ve potansiyel olarak zararlı direnç genlerinin varlığı ile birleşmiştir. Kolonizasyonu destekleyen virülans faktörleri arasında agregasyon maddesi (AS), kollajen bağlayıcı protein (Ace), hücre duvarı adezini (Efa A), enterokokal yüzey proteini (Esp) bulunmaktadır (Hollenbeck ve Rice, 2012; Chajęcka-Wierzchowska ve ark., 2017).

Agregasyon maddesi (AS), enterokokal yüzey proteinidir ve genellikle virülans faktör olarak davrandığı ve antibiyotik direnç genlerini transfer ettiği için halen yoğun çalışmaların konusudur. AS proteinlerinin üretiminden sorumlu genleri içeren konjügatif plazmidler pAD1 (Asa1 proteini), pPD1 (Asp1 proteini) ve pC10 (Asc10 proteini)'dur (Chajęcka-Wierzchowska ve ark., 2017). AS, *Ent. faecalis* hücrelerinin kümelenmesini indükler, bu da AS geninin kodlandığı plazmidin transferini kolaylaştırır (Clewell, 1993). Hücre kültürü denemelerinde AS'ın, *Ent. faecalis*'in ökaryotik hücrelere yapışmasını ve istilasını arttırdığı ve bu nedenle enfeksiyonun birçok evresiyle ilişkili önemli bir virülans faktör olduğu görülmektedir (Kreft ve ark., 1992; Olmsted ve ark., 1994). Ayrıca AS, fibronektin, trombospondin, vitronektin ve kolajen tip I gibi hücre dışı matris proteinlerine bağlanabilir (Rozdzinski ve ark., 2001). AS sadece bağırsak hücrelerine bağlanmada rol oynamaz, aynı zamanda enterokokların internalizasyonunu (içselleşme) arttırır ve hücre içinde hayatta kalmasını ve translokasyonu destekler (Sartingen ve ark., 2000; Franz ve ark., 2011).

Ace, adhezif özelliklere sahip başka bir yüzey proteinidir ve *ace* geni tarafından kodlanır. Bu protein, hem sağlıklı taşıyıcılarda hem de enterokok enfeksiyonu olan kişilerde bulunan *Ent. faecalis* suşlarından izole edilmiştir. AS proteini gibi, Ace de hücre dışı matris proteinlerine bağlanarak kolonizasyonda önemli bir rol oynar (Chajęcka-Wierzchowska ve ark., 2017).

Moleküler ağırlığı yaklaşık 200 kDa olan enterokokal yüzey proteini (Esp), tanımlanan en büyük enterokokal proteindir. Bu proteini kodlayan *esp* geni, antibiyotiklerin aktif çıkışından sorumlu proteinleri de içeren patojenite adasında (PAI) bulunur (Leavis ve ark., 2004). Esp proteini çalışmaları bu protenin, hücreler arasında genetik materyal değişiminde önemli bir rol oynayabilen ve antibiyotiklere karşı direnci arttırabilen biyofilm oluşumuna katıldığını doğrulamıştır (Moreno ve ark., 2006). *Ent. faecium*'da *esp* geninin oluşumunun amfisilin, siprofloksasin ve imipeneme dirençle

ilişkili olduğu belirtilmiştir (Billström ve ark., 2008). Son çalışmalar, bir yüzey proteininin varlığı ile vankomisine direnç arasında bir korelasyon olduğunu öne sürmektedir. Klinik suşlarla ilgili çalışmalar, *Ent. faecium*'un vankomisine dirençli suşlarının % 83.3'ünün *esp* genine sahip olduğunu göstermiştir (Ochoa ve ark., 2013). Ayrıca Billström ve ark. (2008) bu genlerin çoğunun çoklu ilaç direnci gösterdiğini bildirmiştir. *Esp* geninin *Ent. faecium* suşları arasında plazmid konjugasyonu yoluyla ve ayrıca kromozom-kromozom transpozisyonu yoluyla *Ent. faecalis* suşları arasında transfer edilebileceği de gösterilmiştir (Chajęcka-Wierzchowska ve ark., 2017).

2.2.5.3.2. Dokuları etkileyen virülans faktörler

Kolonizasyon sürecinden sonra, patojenik *Enterococcus* spp. konakçının dokuları üzerinde yıkıcı bir etkiye sahip olan toksik maddeler salgılar. Enterokoklar tarafından salgılanan virülans faktörleri arasında sitolizin (Cyl), jelatinaz (GelE) ve hyaluronidaz (Hyl) bulunmaktadır (Chajęcka-Wierzchowska ve ark., 2017).

Sitolizin, en iyi karakterize edilen enterokok virülans faktörlerinden biridir. Gram negatif bakterilere karşı bakteriyosidal özellik ve eritrositlere, lökositlere ve makrofajlara karşı toksik özellikler (β-hemoliz) gösteren bakteriyosin tipi bir ekzotoksindir (De Vuyst ve ark., 2003). Sitolizin üretimi, sekiz gen içeren operonun sorumluluğundadır: *cyl*R_1, *cyl*R_2, *cyl*L_l, *cyl*L_s, *cyl*M, *cyl*B, *cyl*A ve *cyl*I. Operon, güçlü bir şekilde korunmuş feromona bağlı konjugatif plazmidler (örn. PAD1) üzerinde veya diğer virülans belirleyicilerinin (yüzey proteini Esp ve agregasyon maddesi AS) yakınında bakteriyel kromozomdaki patojenite adasında bulunabilir (Eaton ve Gasson, 2001). Sitolizin ekspresyonu, *cyl*L_l ve *cyl*L_s genleri tarafından kodlanan en az beş protein gerektirir. Bir hücrede üretilen sitolizin, *cyl*M geni tarafından kodlanan bir protein yardımıyla dışarıya salgılanır. Hücre dışında sitolizin, *cyl*A geninin kodladığı serin proteaz tarafından aktive edilir ve hücrenin kendisi, sitolizine direncini etkileyen *cyl*I geninin kodladığı bir yüzey proteini tarafından korunur. Sitolizinin ekspresyonu, sırasıyla taşıma proteini CylR1'i ve DNA bağlayıcı protein CylR2'yi kodlayan *cyl*R_1 ve *cyl*R_2 genini içeren bir regülatör sistem tarafından düzenlenir. Sitolizin kodlayıcı genler hem enfeksiyonlardan izole edilen *Enterococcus* suşlarında hem de kommensal mikrobiyotayı oluşturanlarda bulunmuştur. Hem hayvanlardan hem de hayvansal ve bitkisel gıda ürünlerinden izole edilen suşlarda sıklıkla meydana geldiklerini gösteren

çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Sitolizin kodlayan genler *Ent. faecalis, Ent. faecium, Ent. avium, Ent. casseliflavus, Ent. cecorum, Ent. durans, Ent. gallinarum, Ent. malodoratus* ve *Ent. raffinosus* suşlarında tespit edilmiştir (Chajęcka-Wierzchowska ve ark., 2017).

Jelatinaz, moleküler ağırlığı yaklaşık 30 kDa olan hücre dışı, çinkoya bağımlı bir metalloendopeptidazdır. Bu enzim, jelatin, elastin, kolajen, hemoglobinin yanı sıra diğer biyoaktif peptitleri (örn. feromonlara bağlanan proteinler) hidrolize edebilmektedir (Archimbaud ve ark., 2002). Jelatinaz, kromozom üzerinde yer alan *gel*E geni tarafından kodlanır. *gel*E geninin varlığı, hem klinik suşlarda hem de gıdalardan izole edilenler enterokoklarda belirlenen virülans faktörlerden biridir. Jelatinaz konakçı dokuya zarar vererek böylece bakteriyel göç ve yayılmaya yol açar (Franz ve ark., 2011). Genellikle *Ent. faecalis*'te ve *Ent. faecium*'un bireysel suşlarında görülür (Eaton ve Gasson, 2001).

Hiyalüronidaz *hyl* geni tarafından kodlanır ve bağ doku ve kıkırdaktaki mukopolisakkaritlerin zarar görmesinde ve sonuç olarak bakterilerin yayılmasında rol oynar. Klinik suşlardaki hyl geni genellikle *Ent. faecium*'da bulunur ve *Ent. faecalis*'te son derece nadir görülür (Vankerckhoven ve ark., 2004). Gıdalardan izole edilen *Ent. casseliflavus, Ent. mundtii* ve *Ent. durans* gibi diğer suşlarda da tespit edilmiştir (Trivedi ve ark., 2011).

Klinik kökenli suşlar genellikle gıdalar gibi diğer kaynaklardan izole edilenlerden daha fazla virülans faktörü barındırırken, gıdalardan izole edilen suşlar acil bir enfeksiyon kaynağı olmasa da virülans genlerinin yayılmasını teşvik edebilir (Jiménez ve ark., 2013). *Enterococcus* türü bakteriler, konjugasyon yoluyla genetik materyali değiştirebilirler ve bu işlem çoğunlukla gastrointestinal sistemde meydana gelir (Huddleston, 2014). Hemolizin-sitolizin veya antibiyotik direnci gibi çok sayıda enterokokal virülans faktörü, gen değişimi ile transfer edilebilirler. Genellikle bir plazmidin, antibiyotik direncini ve virülans faktörlerini kodlayan genleri içermesi söz konusudur. Bu nedenle, tüketici güvenliği göz önüne alındığında, gıdalardan izole edilen *Enterococcus* suşlarında virülans faktörlerinin varlığını incelemek uygun görünmektedir (Chajęcka-Wierzchowska ve ark., 2017).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Laktik Asit Bakteri Seçimi

214Z054 no'lu Tübitak projesi kapsamında Orta Toroslar yöresinde (Konya-Ereğli, Karaman, Mersin-Mut, Mersin-Anamur) geleneksel yöntemle çiğ sütten (starter kültür kullanılmadan) 32 adet deri Tulum peyniri üretilmiş ve bu peynirlerin depolama sürecinin 7, 15, 30, 60, 90 ve 180. günlerinde LAB izolasyonu yapılmıştır. 180 günün sonunda 1365 adet bakteri saflaştırılmış ve bu bakterilerden gram boyama, katalaz testi, glukozdan gaz oluşturma testi, morfolojik ve mikroskobik görüntüler de dikkate alınarak toplam 432 adeti seçilip PCR amplifikasyonları gerçekleştirildikten sonra sekans analizine tabii tutulmuş ve tanımlamaları yapılmıştır. Bu tez çalışmasında Tübitak projesi kapsamında tanımlaması yapılan LAB koleksiyonundan popülasyonu temsil edecek şekilde 11 adet *Lactobacillus* spp., 10 adet *Enterococcus* spp. ve 8 adet *Streptococcus* spp. seçilerek, farklı ortam şartlarında gelişme ve probiyotik özellikleri incelenmiştir.

3.1.2. Kültür Koşulları

Test edilecek laktik asit bakterileri; de Man Rogosa Sharpe (MRS-Merck 1.10661) ve M17 (Merck 1.15029) sıvı besiyerlerinde (% 25 gliserol) -20 ℃'de saklanmıştır. Çalışma sırasında taze kültür hazırlamak için *Lactobacillus* suşları MRS, *Enterococcus* ve *Streptococcus* suşları M17 sıvı besiyerine % 3 oranında inoküle edilmiş olup *Lactobacillus* ve *Streptococcus* izolatları 37 ℃'de, *Enterococcus* izolatları 30 ℃'de 18 saat inkübe edilerek analizlerde kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Antibakteriyal aktivite ve bakteriyosin üretim testinde indikatör mikroorganizma olarak *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 kullanılmış olup bu bakteriler Konya İl Kontrol Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Patojen mikroorganizmalar analiz öncesinde Brain Heart Infusion (BHI-

Merck 1.10493) sıvı besiyerine % 2 oranında inoküle edilerek 37 ℃'de 18 saat inkübe edilmiş ve kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.2. Analiz Yöntemleri

3.2.1. Laktik asit bakterilerinin farklı ortam şartlarında gelişme özelliklerinin saptanmasında kullanılacak analiz yöntemleri

3.2.1.1. Farklı sıcaklıklarda gelişme

MRS ve M17 sıvı besiyerlerinde 18 saat inkübasyonun ardından aktif hale getirilen stok kültürler tekrar MRS ve M17 sıvı besiyerine % 1 oranında inoküle edilerek 4, 15, 30 ve 45 ℃'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından gelişme gösterenler +++ : çok iyi, ++ : iyi, + : zayıf olarak sınıflandırılmış; gelişme göstermeyenler negatif (-) olarak işaretlenmiştir (Tassou ve ark., 2002)

3.2.1.2. Farklı alkol konsantrasyonlarında gelişme

Laktik asit bakterilerinin etil alkole dayanıklılığı için G-Alegría ve ark. (2004)'nın belirttiği metot modifiye edilerek uygulanmıştır. MRS ve M17 sıvı besiyerlerinde 18 saat inkübasyonun ardından aktif hale getirilen stok kültürler % 3, 6, 12 ve 15 oranında etil alkol içeren ve kontrol olarak etil alkol içermeyen MRS ve M17 sıvı besiyerlerine % 1 oranında inoküle edilmiştir. *Lactobacillus* ve *Streptococcus* suşları 37 ℃'de, *Enterococcus* suşları 30 ℃'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından gelişme gösterenler +++ : çok iyi, ++ : iyi, + : zayıf olarak sınıflandırılmış; gelişme göstermeyenler negatif (-) olarak işaretlenmiştir.

3.2.1.3. Farklı NaCl konsantrasyonlarında gelişme

Farklı NaCl konsantrasyonlarında gelişme testi için MRS ve M17 sıvı besiyerlerinde 18 saat inkübasyonun ardından aktif hale getirilen stok kültürler % 3, 5, 6.5, 8 ve 9 oranında NaCl içeren ve kontrol olarak NaCl içermeyen MRS ve M17 sıvı besiyerlerine % 1 oranında inoküle edilmiştir. *Lactobacillus* ve *Streptococcus* suşları 37 ℃'de, *Enterococcus* suşları 30 ℃'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyonun ardından gelişme gösterenler +++ : çok iyi, ++ : iyi, + : zayıf olarak sınıflandırılmış; gelişme göstermeyenler negatif (-) olarak işaretlenmiştir (Karasu, 2006).

3.2.1.4. Farklı H_2O_2 konsantrasyonlarında gelişme

LAB'ların farklı H_2O_2 konsantrasyonlarında gelişme özellikleri Li ve ark. (2012) tarafından verilen metot modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. MRS ve M17 sıvı besiyerinde 18 saat inkübasyonun ardından aktif hale getirilen stok kültürler 0.4, 0.7 ve 1.0 mM H_2O_2 içeren ve kontrol olarak H_2O_2 içermeyen MRS ve M17 sıvı besiyerlerine % 1 oranında inoküle edilmiştir. *Lactobacillus* ve *Streptococcus* suşları 37 ℃'de, *Enterococcus* suşları 30 ℃'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından gelişme gösterenler +++ : çok iyi, ++ : iyi, + : zayıf olarak sınıflandırılmış; gelişme göstermeyenler negatif (-) olarak işaretlenmiştir.

3.2.1.5. Dondurma ve liyofilizasyona dayanıklılık

Laktik asit bakterilerinin dondurma ve liyofilizasyona dayanıklılık testinde G-Alegría ve ark. (2004) tarafından verilen metot modifiye edilmiştir. MRS ve M17 sıvı besiyerlerinde 18 saat inkübasyonun ardından aktif hale getirilen stok kültürlerden 25 µL alınarak 3 mL MRS ve M17 sıvı besiyerlerine inoküle edilmiş ve *Lactobacillus* ve *Streptococcus* suşları 37 ℃'de, *Enterococcus* suşları 30 ℃'de 24 saat inkübe edilmiştir. Ardından 2000 rpm'de 15 dk santrifuj edilen (Nüve, NF 800R, Türkiye) hücrelerin süpernatant kısmı dökülerek elde edilen pelletler 0.5 mL skim milk besiyeri ile süspanse edilmis ve -70 ℃'de dondurulmuştur. Dondurulan kültürlerden bir kısmı -70 ℃'de muhafaza edilmis, bir kısmıda liyofilizatörde (Teknosem, TRS-2-2, Türkiye) -55 ℃'de 16 saat vakum altında liyofilize edilmiştir. Elde edilen liyofilize kültürler +4 ℃'de saklanmıştır. Skim milk besiyerinde bulunan canlı hücreler MRS ve M17 agarda yayma yöntemi ile ekim yapılarak, dondurma öncesi ve sonrası sayım sonuçlarından dondurmaya dayanıklılık; dondurma öncesi ve liyofilizasyon sonrası sayım sonuçlarından liyofilizasyona dayanıklılık sonuçları aşağıdaki formüle göre (% canlı kalan mikroorganizma) hesaplanmıştır (Karasu, 2006).

$$\% \text{ Canlı Kalan Mikroorganizma} = (X / X_o) \times 100$$

X_0 : Kültürün Baslangıç Canlı Mikroorganizma Sayısı

X : Dondurma/Liyofilizasyon Sonrası Canlı Mikroorganizma Sayısı

3.2.2. Laktik asit bakterilerinin probiyotik özelliklerinin saptanmasında kullanılan analiz yöntemleri

3.2.2.1. Lizozim toleransı

Laktik asit bakterilerinin lizozim toleransı için steril eloktrolit çözeltisi hazırlanmış (0.22 g/L $CaCl_2$, 6.2 g/L NaCl, 2.2 g/L KCl, 1.2 g/L $NaHCO_3$) ve kullanım öncesi 100 mg/L lizozim (Sigma-Aldrich 62970) ilave edilmiştir.

Laktik asit bakterileri 18 saat inkübasyonun ardından santrifüj edilmiş (6000 rpm, 15 dk 4 ℃) (Nüve, NF 800R, Türkiye), elde edilen pelet 2 kez FTS (fosfat tampon solüsyonu) ile yıkanmış ve 2 mL ringer çözeltisi içinde süspanse edilmiştir. Bu süspansiyondan lizozim içeren eloktrolit çözeltisine % 10 oranında inoküle edilmiş ve 0, 30 ve 120. dk'da seri dilüsyonlar hazırlanarak MRS ve M17 agar üzerine ekim yapılmıştır. *Lactobacillus* suşları anaerobik ortamda 37 ℃'de, *Enterococcus* ve *Streptococcus* suşları aerobik ortamda sırasıyla 30 ve 37 ℃'de 48 saat inkübasyonun ardından sayım yapılmış ve sonuçlar log kob/mL olarak ifade edilmiştir (Zago ve ark., 2011).

3.2.2.2. Safra tuzuna dayanıklılık

Laktik asit bakterileri 18 saat inkübasyonun ardından % 0.06, 0.125, 0.25, 0.5 ve 1 oranında sığır safrası (Sigma-Aldrich B3883) içeren ve kontrol olarak safra içermeyen MRS ve M17 sıvı besiyerine % 2 oranında inoküle edilmiştir. *Lactobacillus* ve *Streptocuccus* suşları 37 ℃'de, *Enterococcus* suşları 30 ℃'de 24 saat inkübe edilmiş ve spektrofotometrede (Optizen POP, Kore) 600 nm'de ölçüm yapılmıştır. Sonuçlar % gelişme olarak verilmiştir (Sabir ve ark., 2010).

3.2.2.3. Asit toleransı

Laktik asit bakterilerinin asit toleransı için farklı pH'lardaki sıvı besiyerleri ile çalışılmıştır. Bunun için MRS ve M17 sıvı besiyerlerinin pH'ları 6 M HCl ile 2 ve 3'e ayarlanmıştır. Daha sonra otoklavda 121 ℃'de 15 dk steril edilmiş ve kullanılana kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Laktik asit bakterileri 18 saat inkübasyonun ardından pH ayarlaması yapılan sıvı besiyerlerine % 1 oranında inoküle edilmiş ve inkübasyonun 0 ve 2. saatlerinde 1 mL alınıp seri dilüsyonlar hazırlanarak MRS ve M17 agara ekim yapılmıştır. *Lactobacillus* suşları anaerobik ortamda 37 ℃'de, *Enterococcus* ve *Streptococcus* suşları aerobik ortamda sırasıyla 30 ve 37 ℃'de 72 saat inkübe edildikten sonra sayım yapılmış ve sonuçlar log kob/mL olarak ifade edilmiştir (Mishra ve Prasad, 2005).

3.2.2.4. Mide özsuyuna ve pankreas özsuyuna dayanıklılık

Simule gastrik ve pankreatik sindirim Bautista-Gallego ve ark. (2013)'na göre hazırlanmıştır. Simule sentetik mide özsuyu; pH'sı 2.5 olan, NaCI (2.05 g/L), KH_2PO_4 (0.6 g/L), $CaCI_2$ (0.11 g/L) ve KCI(0.37 g/L) içeren tampon çözeltisinde hazırlanmıştır. pH 2.5'a 1M HCI ile ayarlanmış olan çözelti 121 ℃'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir. Kullanımdan hemen önce pepsin (0.0133 g/L) (Sigma-Aldrich 77160) ve lizozim (0.01 g/L) (Sigma-Aldrich 62970) eklenmiştir. Test edilecek laktik asit bakterileri 1 gece geliştirildikten sonra 10.000 g'de (4 ℃) 10 dk santrifüj edilmiş (VWR Micro Star 17R, Almanya) ve elde edilen pellet sentetik mide özsuyu ile 2 kez yıkanmıştır. Daha sonra hücreler son konsantrasyonu ~9 log kob/mL olacak şekilde sentetik mide özsuyunda yeniden süspanse edilmiştir. 37 ℃'de 3 saat peristaltik hareketi simule etmek amacıyla orbital karıştırıcılı inkübatörde (200 rpm) (Stuart SI500, İngiltere) inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 0 ve 3. saatinde seri dilüsyonlar hazırlanarak MRS ve M17 agara ekim yapılmıştır. *Lactobacillus* suşları anaerobik ortamda 37 ℃'de, *Enterococcus* ve *Streptococcus* suşları aerobik ortamda sırasıyla 30 ve 37 ℃'de 72 saat inkübasyonun ardından sayım yapılmış ve sonuçlar log kob/mL olarak ifade edilmiştir.

Simule pankreatik su için NaCI (8.5 g/L) ve $NH_2PO_4.7H_2O$ (50.81 g/L) içeren tampon çözelti hazırlanmış ve bu çözeltinin pH'sı KH_2PO_4 (1.27 g/L) kullanılarak 8.0'e ayarlanmıştır. Otoklavda 121℃'de 15 dk steril edilen çözeltiye kullanım öncesi safra

(3.0 g/L) ve pankreatin (Sigma-Aldrich P1750) (0.1 g/L) ilave edilmiştir. Test edilecek LAB'lar bir gece geliştirildikten sonra 10.000 g'de (4 ℃) 10 dk santrifüj (VWR Micro Star 17R, Almanya) edilmiş ve elde edilen pellet FTS ile bir kez yıkanmıştır. Daha sonra simule pankreatik suda yeniden süspanse edilmiştir. 37 ℃'de 24 saat boyunca orbital karıştırıcılı inkübatörde (200 rpm) (Stuart SI500, İngiltere) inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 0 ve 24. saatinde seri dilüsyonlar hazırlanarak MRS ve M17 agara ekim yapılmıştır. *Lactobacillus* suşları anaerobik ortamda 37 ℃'de, *Enterococcus* ve *Streptococcus* suşları aerobik ortamda sırasıyla 30 ve 37 ℃'de 72 saat inkübasyonun ardından sayım yapılmış ve sonuçlar log kob/mL olarak ifade edilmiştir.

3.2.2.5. Hidrofobisite

Laktik asit bakterilerinın hidrofobisite özelliklerini belirlemek için hidrokarbon olarak n-hekzadekan (Merck 820633) ve ksilen (Merck 108297) kullanılmıştır. MRS ve M17 sıvı besiyerlerinde 18 saat inkübe edilen kültürler 7000 rpm'de (10 dk, 4 °C) santrifüj edilmiştir (Nüve, NF 800R, Türkiye). Elde edilen peletler FTS ile 2 defa yıkanmış ve en son aynı tampon çözeltide süspanse edilmiştir. Bu hücre süspansiyonunun A_{580} değeri spektrofotometrede (Optizen POP, Kore) ölçülmüş ve kaydedilmiştir (A0). Aynı hücre süspansiyonundan 2 mL alınarak 2 mL hidrokarbon (n-hekzadekan (Merck 820633) ve ksilen (Merck 1.08297)) ilave edilmiş ve 2 dk boyunca karıştırılmıştır. Bu karışım 30 dk oda sıcaklığında bekletilerek faz ayrımı sağlanmıştır. 30 dk sonunda 2 faz oluşmuş ve bu iki fazdan sulu faz dikkate alınarak spektrofotometrede A_{580} değeri ölçülmüştür (A). Spektrofotometre ölçümünde kör olarak bakteri hücresi ilave edilmemiş FTS kullanılmıştır. Aşağıdaki formül kullanılarak bakteri hücrelerinin hidrofobisite değerleri % olarak hesaplanmıştır (Mishra ve Prasad, 2005).

$$\text{Hidrofobisite (\%)} = [(A0-A)/A0] \times 100$$

A0: Kültürün A_{580} değeri

A : n-hekzadekan ve ksilen uygulanmış örneğin A_{580} değeri

3.2.2.6. Otoagregasyon

Laktik asit bakterilerinin otoagregasyon testi Mallappa ve ark. (2019)'na göre yapılmıştır. Laktik asit bakterileri 18 saat inkübasyonun ardından santrifüj edilmiş (6000 rpm, 15 dk 4 °C) (Nüve, NF 800R, Türkiye), elde edilen pelet 2 kez FTS ile yakanmış ve aynı hacimde FTS içinde süspanse edilmiştir. Hücre süspansiyonunun spektrofotometrede (Optizen POP, Kore) A_{600} değeri 0.8-0.9 olacak şekilde aynı çözelti ile ayarlanmış (A_0) ve 24 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 3 ve 24. saatlerinde spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüş ve bakterilerin otoagregasyon kabiliyeti aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmış olup sonuçlar % olarak ifade edilmiştir.

$$\text{Otoagregasyon (\%)} = [1 - (A_T/A_0)] \times 100$$

A_0 = Örneğin 0. saatteki A_{600} değeri
A_T = Örneğin 3 ve 24. satteki A_{600} değeri

3.2.2.7. Antibakteriyal aktivite

Agar-well difüzyon metodu ile tespit edilen antibakteriyal aktivite için indikatör mikroorganizma olarak *Salm.* Typhimurium ATCC 14028, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *Staph. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC 11778 ve *E. coli* ATCC 25922 kullanılmıştır. Test edilecek laktik asit bakterileri (MRS ve M17 sıvı besiyeri) ve indikatör mikroorganizmalar (BHI sıvı besiyeri) bir gece inkübe edilmiştir. Müeller-Hinton agar (Merck 1.05437) içeren petrilere 100 µL indikatör mikroorganizma yayılmıştır. Petriler 4'e bölünerek her bir bölmeye 6 mm çapında kuyucuk açılmıştır. Her bir kuyucuğa 10 µL laktik asit bakterisi ilave edilmiş ve 4 °C'de bir saat bekletilmiştir. Daha sonra 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiş ve oluşan zon çapları ölçülerek sonuçlar milimetre olarak verilmiştir (Ramadan, 2014).

3.2.2.8. Bakteriyosin üretimi

Laktik asit bakterilerinin antibakteriyal aktivitesinin bakteriyosinlerden veya diğer inhibitör etkenlerden (organik asitler ve hidrojen peroksit) kaynaklanıp

kaynaklanmadığının belirlenmesi amacıyla indikatör bakterilere karşı antimikrobiyel etki gösteren suşların MRS ve M17 sıvı besiyerlerinde geliştirilen 18 saatlik aktif kültürleri kullanılmıştır. Kültürler 6500 rpm'de 15 dk 4 ℃'de santrifüj edilmiştir (Nüve, NF 800R, Türkiye). Çöken katı fazın karışmamasına dikkat edilerek süpernantlar yeni tüplere aktarılmıştır. İlk olarak organik asitlerden kaynaklanabilecek antibakteriyal etkiyi ortadan kaldırmak için süpernatantların pH değerleri 6 N NaOH veya 6 N HCl kullanılarak 6.5-7.0'ye ayarlanmıştır. Daha sonra kalıntı hidrojen peroksiti parçalamak için nötralize edilmiş süpernatantlara, son enzim konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde katalaz enzimi (Sigma-Aldrich C9322) ilave edilerek 37 ℃'de 2 saat inkübe edilmiş ve süre sonunda enzim aktivitesini sonlandırmak için 60 ℃'lik su banyosunda 10 dk bekletilmiştir. Ardından bu ortamlar 0.45 µm por çaplı steril membran filtrelerden geçirilerek sterilize edilmiştir. İnhibitör maddeler elimine edildikten sonra antibakteriyal aktivite gösteren suşlar tarafından üretilen maddelerin protein yapısında olup olmadığını tespit etmek için proteolitik enzim uygulaması yapılmıştır. Nötralize edilmiş süpernatantlara son enzim konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde α-kimotripsin (Sigma-Aldrich C4129) ilave edilmiş ve 37 ℃'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Enzim aktivitesini sonlandırmak için 100 ℃'de 5 dk ısı uygulaması yapılmıştır. Daha sonra elde edilen ortamın antibakteiyal etkisi kuyu difüzyon yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir.

Antibakteriyal aktivite testinde kullanılan indikatör mikroorganizmlar BHI sıvı besiyerinde 18 saat inkübe edildikten sonra % 0.7 agar içeren yarı katı besiyerine (5 mL BHI yarı katı besiyeri) 100 µL inoküle edilmiştir. Sonrasında bu besiyerleri MRS ve M17 agar bulunan petrilere homojen bir şekilde yayılmış ve katılaştıktan sonra her bir petri kutusunda 4 tane olacak şekilde 6 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. Ardından kuyucukların dibi 10 µL MRS ve M17 agar ile kapatılmıştır. Yukarıda anlatıldığı gibi elde edilen süpernatantlardan 100 µL alınarak kuyucuklara ilave edilmiştir. 37 ℃'de 24 saat inkübasyonun ardından kuyucuk etrafında zon veren izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Özlü, 2015).

3.2.2.9. Diasetil üretimi

Laktik asit bakterileri 18 saat inkübasyonun ardından 4000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir (Nüve, NF 800R, Türkiye). Elde edilen peletler peptonlu suda

süspanse edilmiş ve 10 mL tam yağlı UHT süte % 1 oranında inoküle edilmiştir. 30 ℃'de 24 saat inkübasyondan sonra 1 mL kültüre 0.5 mL α-naftol (% 1) – KOH (% 16) karışım çözeltisi eklenerek 37 ℃'de 10 dk bekletilmiştir. Diasetil üretimi tüplerdeki pembemsi kırmızı halka oluşumu ile anlaşılmıştır. Sonuçlar halkanın renk yoğunluğuna göre zayıf (+), orta (++) ve güçlü (+++) olarak belirlenmiştir (de Almeida Júnior ve ark., 2015).

3.2.2.10. β-galaktosidaz aktivitesi

β-galaktozidaz aktivitesini belirlemek için modifiye MRS ve M17 sıvı besiyeri hazırlanmıştır. Bu amaçla MRS ve M17 sıvı besiyerlerinin bileşiminde şekerler hariç tüm komponentleri mevcut kalmış, bu şekerler yerine laktoz saf suda çözdürülüp 0.45 µm'lik filtreden geçirildikten sonra son konsantrasyonu % 1 olacak şekilde otoklavlanmış besi ortamına ilave edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan besiyerleri MRS-lac ve M17-lac sıvı besiyeri olarak adlandırılmıştır. 18 saat inkübasyonun ardından aktif hale gelen kültürler MRS ve M17-lac sıvı besiyerlerine % 2 oranında inoküle edilmiş ve bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Analiz için $Na_2HPO_4.2H_2O$ (16.1 g/L), $NaH_2PO_4.2H_2O$ (5.5 g/L), KCl (0.75 g/L), $MgSO_4.7H_2O$ (0.25 g/L), SDS (1.0 g/L) ve β-merkaptoetanol (2.7 ml/L) içeren tampon çözelti kullanılmıştır. MRS ve M17-lac sıvı besiyerlerinde geliştirilen bakteri hücresinden 100 µL alınarak, 2.7 mL tampon çözeltisine ilave edilmiş ve 37 ℃'de 30 dk bekletilmiştir. Ardından 0.6 mL ONPG (4 mg/mL) (Merck 8.41747) ilave edilerek sarı renk oluşumuna kadar 37 ℃'de inkübasyona bırakılmıştır. Sarı renk oluşumundan sonra 2 mL 1M Na_2CO_3 (soğuk) çözeltisi ilave edilerek reaksiyon sonlandırılmıştır. Spektrofotometrede (Optizen POP, Kore) 420 nm'de absorbans değeri ölçülmüştür. β-galaktozidaz aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmış ve Miller Unit (MU) cinsinden verilmiştir (Shekh ve ark., 2016).

$$MU = [(At-Ab)/t]*1000$$

A_t : Hücre içeren reaksiyon karışımının 420 nm'de ölçülen absorbans değeri

A_b: Hücre içermeyen reaksiyon karışımının 420 nm'de ölçülen absorbans değeri

t : Sarı renk oluşumuna kadar geçen süre (dk)

3.2.2.11. Kolesterol asimilasyonu

Serum kolesterolünün düşürülmesi analizi için % 0.3 sığır safrası ve % 0.2 Na-tioglikolat (Sigma-Aldrich T0632) içeren MRS ve M17 sıvı besiyeri hazırlanmış ve otoklavda steril edilmiştir (121 °C'de 15 dk). Otoklav sonrası son konsantrasyon 100 µg/mL olacak şekilde suda çözünür kolesterol (Sigma-Aldrich-C1145) 0.45 µm'lik filtreden geçirilerek ilave edilmiştir. Bir gece geliştirilen laktik asit bakterileri kolesterol içeren sıvı besiyerlerine % 1 oranında inokule edilerek 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası bakteri hücreleri 4000 rpm'de 10 dk (4°C) santrifüj edilerek (Nüve, NF 800R, Türkiye) süpernetant toplanmış ve 1 mL süpernatant üzerine 1 mL % 33'lük KOH çözeltisi, 2 mL etanol ilave edilerek 1 dk vortekslenmiştir. 37 ℃'de 15 dk inkübe edildikten sonra oda sıcaklığına soğutulmuş ve 2 mL saf su, 3 mL hexan ilave edilerek tekrar 1 dk vortekslenmiştir. Vorteks işleminden sonra faz ayrımı için 15 dk oda sıcaklığında bekletilen 2 fazlı karışımın hekzan tabakasından 1 mL alınarak 60 ℃'de evapore edilmiştir. Evaporasyonun ardından kalıntı üzerine 2 mL o-fitaldialdehid (Sigma-Aldrich P1378) ve 500 µL H_2SO_4 ilave edilerek bir dk vortekslenmiştir. Oda sıcaklığında 20 dk inkübasyonun ardından spektrofotometrede (Optizen POP, Kore) 570 nm'de ölçüm yapılmıştır. 3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.5, 100, 250, 500 µg/mL konsantrasyonlarda kolesterol çözeltisi elde edilerek standart eğri çizilmiş olup bu eğri kullanılarak örneklerin kolesterol miktarları µg/mL cinsinden tespit edilmiştir. Kolesterol asimilasyonu aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır (Tomaro-Duchesneau ve ark., 2014).

$$\text{Kolesterol Asimilasyonu (\%)} = \left(\frac{k_0 - k_1}{k_0}\right) x100$$

k_0: Örnek içermeyen sıvı besiyerinin kolesterol miktarı (µg/mL)
k1: Örneğin kolesterol miktarı (µg/mL)

3.2.2.12. Ekzopolisakkarit (EPS) üretimi

EPS üretiminin belirlenmesi amacıyla LAB izolatları 80 mL MRS ve M17 sıvı besiyerine % 1 oranında inoküle edilmiş ve *Lactobacillus* ve *Streptococcus* spp. 37 ℃, *Enterococcus* spp. 30 ℃'de 48 saat geliştirilerek Dertli (2013)'nin tanımladığı metoda göre EPS izolasyonu işlemine tabi tutulmuştur. İlk olarak hücreler 6500 rpm'de (4 ℃

30 dk) santrifüj edilerek pelet ve süpernatant ayrılmıştır. Peletler FTS ile iki kez yıkanmış ve elde edilen pelet ultra saf suda süspanse edilmiştir. Bu süspansiyona 5-6 defa 30 sn'lik aralıklarla 10 sn'lik ultrasound (Hielscher, UP400S model, GmbH, Teltow, Germany) uygulanmıştr. Uygulamalar arasında hücre bozulmasını engellemek amacıyla buzda bekletilmiştir. Ultrasound işlemi sonrasında hücreler 6500 rpm'de (4 °C, 30 dk) santrifüj edilerek (Nüve, NF 800R, Türkiye) bu aşamaya kadar elde edilen tüm süpernetantlar birleştirilmiştir. Süpernatantla eşit miktarda soğuk etanol (-20 °C) ilave edilerek EPS çökeltilmiştir. Bir gece bekletilen örnekler 6500 rpm'de 30 dk 4°C'de santrifüj edilerek çökelen EPS toparlanmıştır. EPS çökeltisi daha sonra 10 mL ultra saf suda hafif bir ısıtma işlemi ile (50 °C'de) çözündürülmüş ve 2 katı kadar soğuk etanol ilave edilerek bir gece daha 4 °C'de bekletilmiştir. Sonraki aşamada santrifüj işlemi tekrar edilerek EPS elde edilmiş ve tekrar ultra saf suda (40 °C) çözündürülmüştür. EPS'ye karışmış olabilecek protein bazlı bileşenlerin uzaklaştırılması için EPS çözeltilerine % 10 oranında TCA çözeltisi (% 100'lük) ilave edilerek 4 °C'de bir gece bekletilmiştir. Tekrar santrifüj edilerek elde edilen süpernatant nötralize edilmiş ve 2 katı hacimde soğuk etanol ilave edilerek 4 °C'de bir gece bekletilmiştir. Çöken EPS santrifüj edilerek süpernetant uzaklaştırılmış ve pelet ultra saf suda çözündürülmüştür. Elde ettiğimiz çökeltide EPS dışında bulunabilecek şeker bazlı bileşenlerin uzaklaştırılması için EPS-saf su çözeltisi 72 saat boyunca diyaliz işlemine (Sigma-Aldrich D6066, 12000 Da) tabii tutulmuştur.

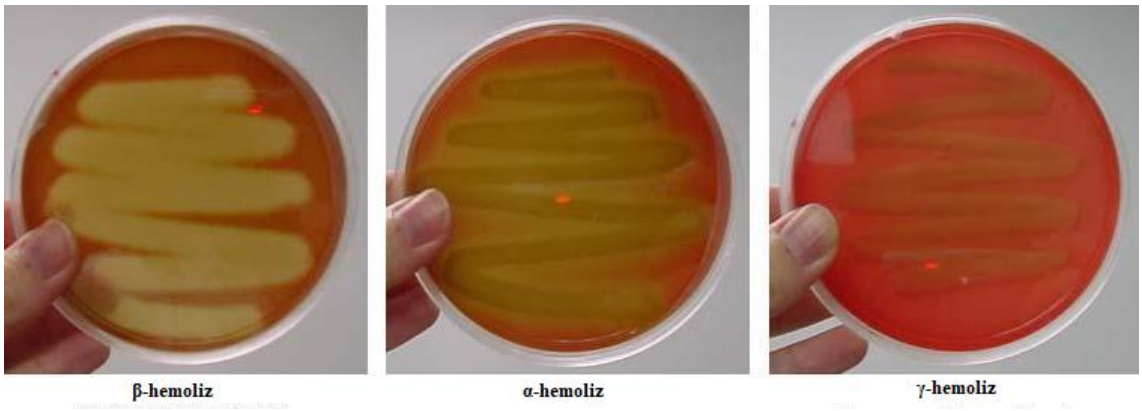
Diyaliz işleminden sonra EPS miktarını belirlemek için fenol-sülfirik asit testi uygulanmıştır (Dubois ve ark., 1956). Bu analiz için glikoz kullanılarak standart seyreltik çözeltiler (0'dan 0.2 mg/mL'ye kadar) hazırlanmış ve standart çözeltiler ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Spektro küvetlerinin her birine 200 µL örnek konularak üzerine 600 µL % 98'lik H_2SO_4 ve 120 µL % 5'lik fenol ilave edilmiştir. Renk gelişimi için 5 dk beklenmiş ve spektrofotometrenin OD değeri 490 nm'ye ayarlanmıştır. Süre bitimini takiben küvetler spektrofotometreye konularak ölçüm yapılmış (marka) ve glikoz eğrisi kullanılarak örneklerin EPS miktarı belirlenmiştir. Sonuçlar µg/mL olarak verilmiştir.

3.2.2.13. Antibiyotik direnci

Antibiyotik direnç testi için amfisilin (10 µg), kloramfenikol (30 µg), eritromisin (15 µg), gentamisin (10 µg, Bioanalyse), kanamisin (30 µg), penisilin (10 U), streptomisin (10 µg), tetrasiklin (30 µg) ve vankomisin (30 µg) antibiyotik diskleri kullanılmıştır. Test edilecek laktik asit bakterileri 1 gece geliştirildikten sonra MRS ve M17 agar içeren petrilere 100 µL yayılmıştır. Petriler 4'e bölünerek her bir bölmenin ortasına birer antibiyotik diski yerleştirilmiştir. *Lactobacillus* suşları 37 ℃'de anaerobik ortamda, *Enterococcus* ve *Streptocuccus* suşları aerobik ortamda sırasıyla 30 ve 37 ℃'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında disk etrafında oluşan zon çapları mm olarak ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Cockerill ve ark. (2013)'a göre dirençli (D), yarı hassas (YH) ve hassas (H) olarak değerlendirilmiştir (Angmo ve ark., 2016).

3.2.2.14. Hemolitik aktivite

Hemolitik aktivite testi için laktik asit bakterileri 18 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında % 5 defibrine koyun kanı ile katkılandırılmış Blood Agar (Merck 1.10886) petrilerine her petride 2 bakteri suşu olacak şekilde öze ile çizim yapılmıştır. *Lactobacillus* suşları 37 ℃'de anaerobik ortamda, *Enterococcus* ve *Streptocuccus* suşları aerobik ortamda sırasıyla 30 ve 37 ℃'de 48 saat inkübe edilmiştir. 48 saat sonunda hemolitik reaksiyon, kırmızı kan hücrelerinin kısmi hidrolizi sonucunda yeşil zon oluşumu ile α-hemoliz; kırmızı kan hücrelerinin tamamıyla hidrolizi sonucunda şeffaf zon oluşumu ile β-hemoliz; zon oluşmaması ile γ-hemoliz olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.1). Analizde referans suş olarak *Staph. aureus* ATCC 25923 (β-hemolitik) ve *E. coli* ATCC 25922 (α-hemolitik) kullanılmıştır (de Almeida Júnior ve ark., 2015).



Şekil 3.1: α, β ve γ hemolitik aktivitenin petri görüntüsü

3.2.2.15. Biyojen amin üretimi

Laktik asit bakterilerinin biyojen amin üretimi Bover-Cid ve Holzapfel (1999) metoduna göre analiz edilmiştir. Dekarboksilaz sıvı besiyerine (Sigma-Aldrich D2935) % 1 oranında L-lisin (Sigma-Aldrich L5501), L-tirosin (Merck 1.08371), L-ornitin (Sigma-Aldrich O2375) ve L-arjinin (Merck 1.01542) amino asitleri ilave edilmiş ve pH 5.3'e ayarlanmıştır. Hazırlanan sıvı besiyerleri otoklavda 121 °C'de 10 dk steril edildikten sonra bir gece geliştirilen laktik asit bakterileri % 0.1 oranında inoküle edilmiş ve 30 °C'de 4 gün inkübasyona bırakılmıştır. Laktik asit bakterilerinin biyojen amin üretip üretmediği besiyerinin renginin sarıdan mor eflatuna dönüşümü ile anlaşılmış olup renk dönüşümü olanlar (+), renk dönüşümü olmayanlar (-) olarak belirtilmiştir.

3.2.2.16. Virülans gen tespiti

Probiyotik özellik gösteren *Enterococcus* izolatları için, jelatinaz (*gelE*), agregasyon maddesi (*asa1*), hiyalüronidaz (hyl_{efm}) ve sitolizin (*CylA*) aktivatörü, sitolizin taşınması (*CylB*), sitolizin öncülleri ($CylL_l$ ve $CylL_s$), sitolizin modifikasyonu (*CyllM*) için kodlanan virülans genlerinin varlığı PCR amplifikasyonları ile tespit edilmiştir. Toplam bakteriyel DNA izolasyonu MolBio (MB 505-50) bakteri genomik DNA saflaştırma kiti ile yapılmıştır. Primerler ve bunların ürün boyutları Tablo 3.1'de verilmiştir. Amplifikasyon reaksiyonları, 2 µL 10X Taq buffer, 0.4 µL 10 mM dNTP karışımı, 0.4 µL 10 µM F primer, 0.4 µL 10 µM R primer, 14.7 µL DEPC, 0.1 µL Taq DNA polimeraz ve 2 µL DNA içeren 20 µL reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir.

Tüm reaktifler ve enzim Merck KGaA'dan (Darmstadt, Almanya) temin edilmiştir. Virülans özelliklerinin amplifikasyonları için termal döngüleme (BioRAD, T100™, Foster City, California, USA) aşağıdaki koşullarda programlanmıştır: 95 ℃'de 30 sn, 34 döngü için 95 ℃'de 30 sn, 56 ℃'de 30 sn, 68 ℃'de 90 sn ve 68 ℃'de 5 dk. PCR ürünleri, 0.5 x TBE tamponunda 1.5 w/v agaroz jel ile elektroforeze tabi tutulmuş ve etidyum bromür boyaması ile görselleştirilmiştir.

Tablo 3.1: Virülans genlerin saptanmasında kullanılacak primer dizilimleri ve ürün büyüklüğü

Hedef Gen	Primer Dizilimi (5'-3')	Ürün Büyüklüğü (bç)	Kaynak
$CylL_l$	F:GATGGA GGG TAAGAATTAGG R:GCT TCACCTCACTAAGTTTTATAG	253	Maasjost ve ark. (2019)
$CylL_s$	F:AGA ACT TGT TGG TCC TTC R:GCT GAA AAT AAT GCA CCT AC	742	Eaton ve ark. (2001)
CylM	F:CTG ATG GAA AGA AGA TAG TAT R:TGA GTT GGT CTG ATT ACA TTT	742	Eaton ve ark. (2001)
CylB	F:ATT CCT ACC TAT GTT CTG TTA R:AAT AAA CTC TTC TTT TCC AAC	843	Eaton ve ark. (2001)
CylA	F:TGG ATG ATA GTG ATA GGA AGT R:GCT GCT AAA GCT GCG CTT	688	Eaton ve ark. (2001)
GelE	F:ACC CCG TAT CAT TGG TTT R:AGA TGC ACC CGA AAT AAT ATA	213	Eaton ve ark. (2001)
Hyl_{efm}	F:GAG TAG AGG AAT ATC TTA GC R:AGG CTG CAA TTC TGT	661	Maasjost ve ark. (2019)
asa1	F:GCA CGC TAT TAC GAA CTA TGA R:AAA CGG CAA GAC AAG TAA ATA	375	Vankerckhoven ve ark. (2004)

F: forward primer; R: reverse primer

3.2.3. İstatistiki analiz

Tüm veriler, iki tekerrürün aritmetik ortalama ve standart sapması olarak verilmiştir. Sonuçlar, bakteriyel kültürler ve uygulamalar arasındaki önemli farklılıkları belirlemek için Minitab 16 (State College, ABD) istatistik programında one-way ANOVA'ya tabi tutulmuştur. Sonuçlar arasındaki önemli farklılıklar Tukey testi ile 0.05 düzeyinde karşılaştırılmıştır.

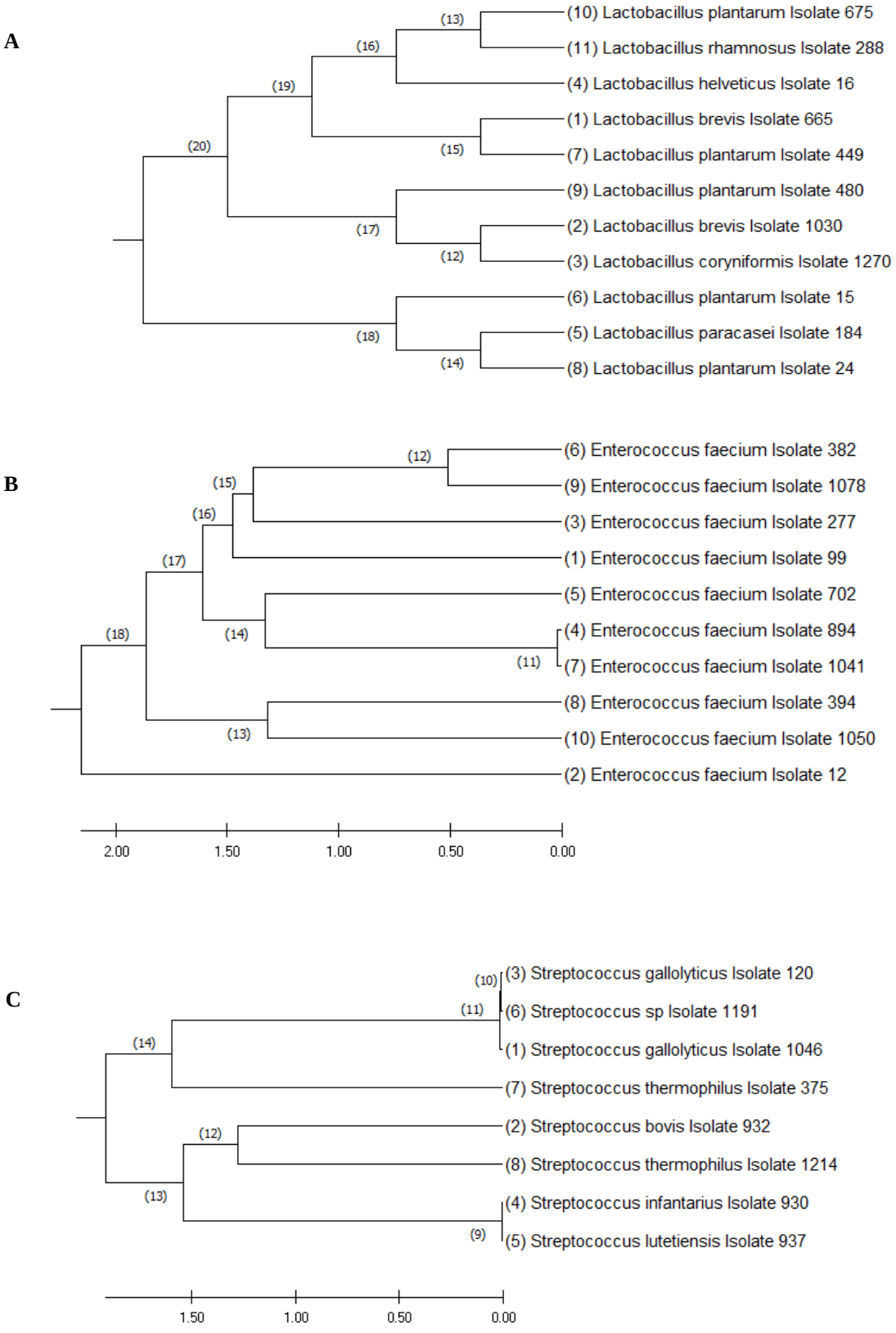
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanmasına Ait Sonuçlar ve Tartışma

Tulum peynirlerinden izole edilen laktik asit bakterinin moleküler tanımlaması 16S rRNA analizi ile yapılmıştır. Tür benzerlikleri NCBI'da (National Center for Biotechnology Information) nükleotit blast gerçekleştirilerek belirlenmiştir. İzolatların genbank erişim numaraları ve benzerlik oranları Tablo 4.1'de verilmiştir. Moleküler tanımlamaya göre *Lb. brevis* (n=2), *Lb. coryniformis* (n=1), *Lb. helveticus* (n=1), *Lb. paracasei* (n=1), *Lb. plantarum* (n=5), *Lb. rhamnosus* (n=1), *Ent. faecium* (n=10), *S. gallolyticus* (n=2), *S. bovis* (n=1), *S. infantarius* (n=1), *S. lutetiensis* (n=1), *Streptococcus* sp. (n=1) ve *S. thermophilus* (n=2) tespit edilmiştir. *Lactobacillus, Enterococcus* ve *Streptococcus* spp. arasındaki benzerliği temsil eden filogenetik ağaç, MEGA-X (Versiyon 10.1.6) programında oluşturulmuş ve Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1: Laktik asit bakterilerinin 16S rRNA gen dizilimi ile tanımlanması ve NCBI-BLAST'tan uyarlanmış Genbank erişim numaraları.

İzolat Kodu	Bilinen En Yakın Suş ve Numarası	Benzerlik Oranı (%)	Genbank Erişim No
665	*Lactobacillus brevis* (a88)	99	KX057568.1
1030	*Lactobacillus brevis* (TMW 1.2111)	99	CP019743.1
1270	*Lactobacillus coryniformis* (B518)	99	MF540549.1
16	*Lactobacillus helveticus* (L47)	99	KP317715.1
184	*Lactobacillus paracasei* (RCM2)	93	KT626389.1
15	*Lactobacillus plantarum* (AAHED-10)	98	KP128055.1
449	*Lactobacillus plantarum* (CSCWL 6-9)	99	KR055058.1
24	*Lactobacillus plantarum* (L14)	97	KY582835.1
480	*Lactobacillus plantarum* (L21)	99	MF155781.1
675	*Lactobacillus plantarum* (LZ95)	99	CP012122.1
288	*Lactobacillus rhamnosus* (LRB)	99	CP016823.1
99	*Enterococcus faecium* (2014-VREF-41)	99	CP019208.1
12	*Enterococcus faecium* (CAU2770)	98	MF428851.1
277	*Enterococcus faecium* (CAU2901)	99	MF429576.1
894	*Enterococcus faecium* (CAU3651)	99	MF429604.1
702	*Enterococcus faecium* (CAU4595)	99	MF357357.1
382	*Enterococcus faecium* (CAU4739)	96	MF428917.1
1041	*Enterococcus faecium* (CAU8746)	99	MF424177.1
394	*Enterococcus faecium* (CSCWL1-4)	97	KM985450.1
1078	*Enterococcus faecium* (L175(LBF2)F04)	99	KM269700.1
1050	*Enterococcus faecium* (LOCK 0965)	99	KJ919969.1
1046	*Streptococcus gallolyticus* (CAU3063)	99	MF582800.1
932	*Streptococcus bovis*	99	AJ305257.1
120	*Streptococcus gallolyticus* (CAU5244)	99	MF429652.1
930	*Streptococcus infantarius* (CNM415_12)	99	KC699159.1
937	*Streptococcus lutetiensis* (3-1)	99	KJ540923.1
1191	*Streptococcus* sp. (CAU9313)	99	MF429394.1
375	*Streptococcus thermophilus* (DM8309)	99	KT820079.1
1214	*Streptococcus thermophilus* (IMAU40051)	99	FJ749326.1



Şekil 4.1: *Lactobacillus* (A), *Enterococcus* (B) ve *Streptococcus* (C) izolatlarının 365F ve 1064R primerleri kullanılarak PCR ile belirlenen 16S rRNA sekanslarının komşu bağlantı yöntemine göre düzenlenen filogenetik ağacı.

4.2. Laktik Asit Bakterilerinin Farklı Ortam Şartlarında Gelişme Özelliklerine Ait Sonuçlar ve Tartışma

Lactobacillus, Enterococcus ve *Streptococcus* suşlarının farklı ortam şartlarında gelişme özelliklerine (farklı sıcaklıklarda gelişme, farklı alkol, NaCl ve H_2O_2 konsantrasyonlarında gelişme) ait sonuçlar Tablo 4.2'de verilmiştir.

İzolatların 4, 15, 30 ve 45 ℃'de gelişme eğilimleri incelenmiştir. Çalışmada incelenen tüm laktobasil, enterokok ve streptokok izolatları 30 ve 45 ℃'de iyi gelişme gösterirken 4 ℃'de hiçbir izolatta gelişme gözlemlenmemiştir. 24, 480 ve 675 no'lu laktobasil, 99 ve 894 dışındaki tüm enterokok ve 120, 937, 1191, 375 no'lu streptokok izolatları 15 ℃'de zayıf gelişme göstermiş olup, izolat 894 ve 932 iyi gelişme gösterirken geri kalan 12 izolatta gelişme tespit edilmemiştir.

Laktik asit bakterilerinin gelişme sıcaklıklarının belirlenmesi tanımlama yanında fermente gıdaların üretim ve depolama şartlarının belirlenmesinde de önem taşımaktadır. Ertekin ve Çon (2014) çalışmalarında inceledikleri LAB'ların tamamının 15 ℃'de gelişme gösterdiklerini ve izolatların 15 ℃'de gelişebilmelerinin asidik fermente gıdalarda starter olarak kullanım için yeterli potansiyele sahip olduğu şeklinde ifade edilebileceğini bildirmiştir.

Laktik asit bakterileri % 3, 6, 12 ve 15 oranında etil alkol ilave edilmiş MRS ve M17 sıvı besiyerlerinde inkübasyona bırakılmış ve alkole karşı toleransları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre % 3 alkol konsantrasyonunda tüm suşlar iyi gelişme göstermişlerdir. % 6 alkol konsantrasyonunda *Lactobacillus* suşlarında 1270, 16 ve 184; *Enterococcus* suşlarında 99, 382 ve 394; *Streptococcus* suşlarında ise 1046, 120, 937 ve 1191 no'lu izolatlar zayıf gelişme gösterirken geri kalan izolatlar iyi gelişme göstermişlerdir. % 12 alkol konsantrasyonunda 24, 480 ve 288 no'lu izolatlar iyi gelişme göstermiş % 15 alkol konsantrasyonunda 480 no'lu izolat haricindekilerde herhangi bir gelişme gözlemlenmemiştir.

Tablo 4.2: *Lactobacillus*, *Enterococcus* ve *Streptococcus* suşlarının farklı sıcaklıkta, farklı alkol, NaCl ve H_2O_2 konsantrasyonlarında gelişme özelliklerine ait sonuçlar*

		Sıcaklık (°C)				Alkol Konsantrasyonu (%)				NaCl Konsantrasyonu (%)					H_2O_2 Konsantrasyonu (mM)		
	İzolat No	4	15	30	45	3	6	12	15	3	5	6.5	8	9	0.4	0.7	1.0
Lactobacillus spp.	665	-	-	+++	++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++
	1030	-	-	+++	++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	++	-	+++	+++	+++
	1270	-	-	++	++	+++	+	-	-	+++	++	-	-	-	+++	+++	+++
	16	-	-	+++	+++	++	+	-	-	+++	+	-	-	-	+++	+++	+++
	184	-	-	+++	++	++	+	-	-	+++	+	-	-	-	+++	+++	+++
	15	-	-	+++	++	+++	++	-	-	+++	++	-	-	-	+++	+++	+++
	449	-	-	+++	++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	+	-	+++	+++	+++
	24	-	+	+++	++	+++	+++	++	-	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
	480	-	+	+++	++	+++	+++	++	+	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++
	675	-	+	+++	++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++
	288	-	-	++	++	+++	+++	++	-	+++	+++	+++	+	-	+++	+++	+++
Enterococcus spp.	99	-	-	+++	+++	+++	+	-	-	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++
	12	-	+	+++	+++	+++	++	-	-	+++	+++	+++	++	-	+++	+++	+++
	277	-	+	+++	+++	+++	++	-	-	+++	+++	++	+	-	+++	+++	+++
	894	-	++	+++	+++	+++	++	-	-	+++	+++	+++	++	-	+++	+++	+++
	702	-	+	+++	+++	+++	++	-	-	+++	+++	+++	+	-	+++	+++	+++
	382	-	+	+++	+++	+++	+	-	-	+++	+++	+++	+	-	+++	+++	+++
	1041	-	+	+++	+++	+++	++	-	-	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++
	394	-	+	+++	+++	+++	+	-	-	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++
	1078	-	+	+++	+++	+++	++	-	-	+++	+++	+++	++	+	+++	+++	+++
	1050	-	+	+++	+++	+++	++	-	-	+++	+++	+	-	-	+++	+++	+++
Streptococcus spp.	1046	-	-	+++	+++	+++	+	-	-	+++	+++	+	-	-	+++	+++	+++
	932	-	++	+++	+++	+++	++	-	-	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++
	120	-	+	+++	+++	+++	+	-	-	+++	+++	++	-	-	+++	+++	+++
	930	-	-	+++	+++	++	++	-	-	+++	+++	++	-	-	+++	+++	+++
	937	-	+	+++	+++	+++	+	-	-	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++
	1191	-	+	+++	+++	+++	+	-	-	+++	+++	++	-	-	+++	+++	+++
	375	-	+	+++	+++	+++	++	-	-	+++	+++	++	+	-	+++	+++	+++
	1214	-	-	+++	+++	++	++	-	-	+++	+++	+++	+	-	+++	+++	+++

*(-):gelişme yok; (+):zayıf ; (++):iyi; (+++): çok iyi

Ertekin (2007) % 10 alkole dayanıklılığın probiyotik özellik açısından yeterli bir kriter olduğunu ve çalışmada incelediği 42 LAB suşundan 37'sinin % 10 alkolde gelişme göstermesi nedeni ile probiyotik kültür için gerekli kritere sahip olduğunu belirtmiştir. Ayrıca sadece 5 izolatın % 15 alkol konsantrasyonunda gelişme gösterdiğini bildirmiş ve bizim çalışmamızla benzer sonuçlar ortaya koymuştur.

Lactobacillus, Enterococcus ve *Streptococcus* izolatlarının % 3, 5, 6.5, 8 ve 9 NaCl konsantrasyonlarında gelişimleri incelenmiştir. Farklı NaCl konsantrasyonlarında gelişme sonuçlarına göre laktobasillerin hepsi % 3 ve 5 NaCl konsantrasyonlarında gelişebilme kabiliyetindedir. % 6.5 ve 8 konsantrasyonlarda ise 1270, 16, 184 ve 15 no'lu izolat dışındakiler gelişme göstermişken % 9 NaCl konsantrasyonunda 24, 480 ve 675 no'lu izolatlar iyi, 665 no'lu izolat zayıf gelişme göstermiş olup diğer izolatlarda herhangi bir gelişme gözlemlenmemiştir.

Enterokoklarda tüm izolatlar % 3, 5 ve 6.5 NaCl konsantrasyonunda gelişebilme kabiliyeti göstermişlerdir. % 8 NaCl konsantrasyonunda 394 ve 1050 no'lu izolatlar gelişme göstermemiş olup 12, 894 ve 1078 no'lu izolatlar iyi gelişme gösterirken diğer 5 izolat zayıf gelişme göstermiştir. % 9 NaCl konsantrasyonunda ise 99, 1041 ve 1078 no'lu izolatlar azda olsa gelişirken geri kalan enterokok izolatlarında herhangi bir gelişme gözlemlenmemiştir.

Streptococcus suşlarının hepsi % 3 ve 5 NaCl konsantrasyonlarında çok iyi gelişme gösterirken % 6.5 NaCl konsantrasyonunda sadece 932 no'lu izolatta gelişme yoktur. 375 ve 1214 no'lu izolatlar % 8 NaCl oranında zayıfta olsa gelişme gözlemlenmiş olup geri kalan 6 streptokok izolatında gelişme meydana gelmemiştir. Streptokokların hiçbiri % 9 NaCl konsantrasyonunu tolere edememiştir.

NaCl toleransı, LAB tarafından fermantasyonunun hızla başlamasına ve böylece asit üretimine olanak sağlamakta, ayrıca NaCl'ye tolerans göstermeyen rekabetçi flora üzerinde de baskılayıcı etki göstermektedir (Başdoğan, 2020). Okuklu (2014) yoğurttan izole edilen LAB'ların % 2, 4, 6.5, 8 ve 10 NaCl konsantrasyonlarında gelişme eğilimlerini incelemiş ve izolatların tüm konsantrasyonlarda gelişebildiğini tespit etmiştir. Ayrıca ekstrem koşullarda gelişme yeteneğinin süt endüstrisinde kullanılan starter kültürler için önemli olduğunu ve yüksek tuz konsantrasyonunu tolere edebilme yeteneğinin ayran gibi üretiminde NaCl kullanılan ürünlerde kullanılan starter

bakterilere avantaj sağlayacağını bildirmiştir. Karasu (2006) izole ettiği tüm LAB suşlarının % 6-8 NaCl konsantrasyonlarında rahatlıkla geliştiğini ve bu durumun turşu ve zeytin gibi fermente gıdalarda starter olarak kullanılabilmeleri için yeterli olduğunu öne sürmüştür.

Hidrojen peroksitin bakteriosit etkisinden dolayı bu bileşiğe dayanıklılık, probiyotik mikroorganizmalar için önemli bir özelliktir. Bu nedenle test edilen laktik asit bakterileri 0.4, 0.7 ve 1.0 mM H_2O_2 içeren MRS ve M17 sıvı besiyerinde inkübasyona bırakılmıştır. Verilen sonuçlara göre tüm *Lactobacillus, Enterococcus* ve *Streptococcus* izolatları çalışmada kullanılan 3 farklı H_2O_2 konsantrasyonunda da çok iyi gelişme göstermişlerdir.

Karasu (2006) *Lb. plantarum* ve *Lb. pentosus* izolatlarının 2000, 10000 ve 20000 ppm H_2O_2 konsantrasyonlarında ortalama % gelişme oranlarını sırasıyla % 2.41, 1.06 ve 1.13 olarak vermiştir.

Test edilen *Lactobacillus, Enterococcus* ve *Streptococcus* suşları 8.43-9.55 log kob/mL arasında içerecek şekilde liyofilizasyon ortamına eklendikten sonra dondurma ve liyofilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Dondurma öncesi, dondurma sonrası ve liyofilizasyon sonrası sayım yapılarak *Lactobacillus, Enterococcus* ve *Streptococcus* suşlarının dondurma ve liyofilizasyona dayanıklılıkları sırasıyla Tablo 4.3, 4.4 ve 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.3: *Lactobacillus* suşlarının dondurma ve liyofilizasyona dayanıklılık sonuçları

İzolat no	Dondurma Öncesi	Dondurma Sonrası		Liyofilizasyon sonrası	
	log kob/mL	log kob/mL	% canlılık	log kob/mL	% canlılık
665	8.88 ± 0.03^{bc}	8.32 ± 0.06^{abcd}	93.64	8.50 ± 0.06^{a}	95.62
1030	9.34 ± 0.02^{a}	8.54 ± 0.07^{ab}	91.39	8.25 ± 0.01^{a}	88.32
1270	8.92 ± 0.03^{b}	8.51 ± 0.05^{ab}	95.35	8.57 ± 0.05^{a}	96.10
16	8.72 ± 0.06^{bcd}	8.65 ± 0.04^{ab}	99.27	8.42 ± 0.09^{a}	96.62
184	8.70 ± 0.10^{bcd}	8.28 ± 0.19^{bcd}	95.14	8.33 ± 0.08^{a}	95.70
15	8.63 ± 0.05^{bcd}	8.69 ± 0.08^{a}	100.71	8.45 ± 0.11^{a}	97.93
449	8.43 ± 0.21^{d}	8.09 ± 0.05^{d}	95.92	8.48 ± 0.02^{a}	100.56
24	8.89 ± 0.07^{bc}	8.11 ± 0.17^{cd}	91.17	8.45 ± 0.18^{a}	95.02
480	8.65 ± 0.04^{bcd}	8.54 ± 0.04^{ab}	98.72	8.47 ± 0.01^{a}	97.99
675	8.60 ± 0.02^{cd}	8.48 ± 0.13^{abc}	98.60	8.31 ± 0.14^{a}	96.64
288	8.91 ± 0.01^{bc}	8.10 ± 0.01^{cd}	90.89	8.42 ± 0.15^{a}	94.57

Verilen değerler 2 tekerrürün aritmetik ortalamasıdır ve aritmetik ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir.
Önemli farklılıklar Tukey testi ile $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir.
Aynı sütundaki istatistiki farklılıklar küçük harf ile ifade edilmiştir.

Dondurmaya dayanıklılık sonuçlarına göre dondurma işlemi sonrasında laktik asit bakteri suşlarının % canlılığı 90.89-103.46 arasında değişmekle birlikte izolatlar canlılığını yüksek oranda korumuştur. Dondurma işlemine en dayanıklı suşlar laktobasiller arasında 15, enterokoklarda 1041, streptokoklarda ise 1214 no'lu izolat olup % gelişmeleri sırasıyla 100.71, 103.46 ve 100.83 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.4: *Enterococcus* suşlarının dondurma ve liyofilizasyona dayanıklılık sonuçları

İzolat no	Dondurma Öncesi	Dondurma Sonrası		Liyofilizasyon sonrası	
	log kob/mL	log kob/mL	% canlılık	log kob/mL	% canlılık
99	9.38±0.21^{a}	8.63±0.25^{c}	92.00	8.48±0.21^{d}	90.35
12	9.32±0.02^{a}	9.21±0.01^{ab}	98.76	9.21±0.02^{ab}	98.80
277	9.30±0.04^{ab}	9.24±0.01^{a}	99.38	9.03±0.03^{abc}	97.08
894	9.26±0.02^{ab}	8.87±0.08^{bc}	95.80	8.96±0.12^{abc}	96.74
702	9.36±0.04^{a}	9.23±0.04^{a}	98.60	9.18±0.03^{ab}	98.05
382	9.37±0.05^{a}	9.24±0.04^{a}	98.61	9.06±0.04^{abc}	96.75
1041	8.89±0.07^{c}	9.20±0.03^{ab}	103.46	9.25±0.00^{a}	104.05
394	9.20±0.05^{abc}	8.74±0.03^{c}	95.01	8.72±0.12^{cd}	94.87
1078	9.00±0.06^{bc}	8.80±0.02^{c}	97.74	8.84±0.09^{bcd}	98.25
1050	9.26±0.05^{ab}	9.26±0.01^{a}	99.97	8.54±0.13^{d}	92.19

Verilen değerler 2 tekerrürün aritmetik ortalamasıdır ve aritmetik ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir.
Önemli farklılıklar Tukey testi ile $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir.
Aynı sütundaki istatistiki farklılıklar küçük harf ile ifade edilmiştir.

Yapılan çalışma sonrası elde edilen sonuçlara göre laktik asit bakteri suşlarının liyofilizasyon işlemi sonrası % canlılık değerleri 88.32.35-104.05 arasında değişmektedir. *Lactobacillus, Enterococcus* ve *Streptococcus* suşları arasında liyofilizasyona en dayanıklı olarak sırasıyla 449 (% 100.56), 1041 (% 104.5) ve 1214 (% 101.71) no'lu izolatlar tespit edilmiştir. Liyofilizasyon sonrası % canlılık olarak en düşük değerlere sahip izolatlar laktobasillerde 1030 (% 88.32), enterokoklarda 99 (% 90.35) ve streptokoklarda 937 (% 94.19) no'lu izolat olarak belirlenmiştir.

Karasu (2006) dondurma ve liyofilizasyona dayanıklılığın starter kültür ve probiyotik olarak kullanılması amaçlanan laktik asit bakterileri için önemli olduğunu söylemiş olup çalışmalarında *Lb. plantarum* suşlarının dondurma sonrası gelişme oranlarını % 79.01-104.09 arasında, liyofilizasyon sonrası gelişme oranlarını ise % 72.11-108.29 arasında tespit edildiğini belirtmiş ve bu çalışmamızda elde edilen sonuçlar Karasu (2006)'nun sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Aynı şekilde benzer sonuçlara G-Alegría ve ark. (2004) tarafından yapılan çalışmada da rapor edilmiştir.

Tablo 4.5: *Streptococcus* suşlarının dondurma ve liyofilizasyona dayanıklılık sonuçları

İzolat no	Dondurma Öncesi	Dondurma Sonrası		Liyofilizasyon sonrası	
	log kob/mL	log kob/mL	% canlılık	log kob/mL	% canlılık
1046	9.26±0.01^{b}	8.86±0.02^{bc}	95.70	9.03±0.04^{abc}	97.48
932	8.69±0.02^{e}	8.23±0.04^{d}	94.69	8.23±0.09^{e}	94.60
120	9.55±0.03^{a}	9.11±0.01^{a}	95.43	9.09±0.06^{ab}	95.20
930	9.20±0.07^{bc}	8.83±0.00^{c}	95.99	8.87±0.10^{bcd}	96.42
937	9.32±0.05^{b}	8.88±0.03^{bc}	95.21	8.78±0.05^{cd}	94.19
1191	9.02±0.02^{d}	8.93±0.02^{b}	99.00	8.60±0.10^{d}	95.37
375	9.27±0.03^{b}	9.16±0.01^{a}	98.81	9.00±0.05^{abc}	97.03
1214	9.06±0.05^{cd}	9.13±0.01^{a}	100.83	9.21±0.07^{a}	101.71

Verilen değerler 2 tekerrürün aritmetik ortalamasıdır ve aritmetik ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir.
Önemli farklılıklar Tukey testi ile $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir.
Aynı sütundaki istatistiki farklılıklar küçük harf ile ifade edilmiştir.

Klingberg ve Budde (2006) liyofilize iki *Lb. plantarum* suşunun insan gastrointesitnal sisteminde yüksek canlılık gösterdigini, hatta konakçıya spesifik davranışlar gösterdigini belirtmislerdir. Zhao ve Zhang (2005) çalışmada kullandıkları *Lb. brevis* izolatı hızlı bir Şekilde -65 ℃'ye soğutulduğunda % 65.2 oranında canlı kaldığını, fakat yavaş bir Şekilde -20 ℃'ye soğutulduğunda % 46.4 oranında canlı kaldığını tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda elde edilen veriler, çalışmada kullandığımız tüm *Lactobacillus, Enterococcus* ve *Streptococus* izolatlarının dondurma ve liyofilizasyon yöntemleri ile rahatlıkla saklanabileceği ve probiyotik starter olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Ekstrem gelişme koşullarında ise özellikle 24, 480 ve 675 no'lu laktobasil izolatları yüksek gelişme özellikleri sergilemişlerdir.

4.3. Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Özelliklerine Ait Sonuçlar ve Tartışma

4.3.1. Lizozim toleransı sonuçları ve tartışma

Tez çalışmasında LAB'ların lizozim toleransları 100 µg/mL lizozim içeren ortamda test edilmiş olup 30 ve 120 dk sonraki canlı kalabilirlikleri değerlendirilmiştir. *Lactobacillus, Enterococcus* ve *Streptococcus* izolatlarına ait sonuçlar sırasıyla Tablo 4.6, 4.7 ve 4.8'te verilmiştir.

Tüm LAB izolatlarının 0. dakikada 7.03-8.90 log kob/mL arasında belirlenen hücre yoğunlukları 30 dakika sonra 5.19-8.34 log kob/mL arasında değişirken 120 dk sonra 4.38-8.05 log kob/mL arasında tespit edilmiştir. *Lactobacillus* suşları arasında 120

dk sonunda lizozime karşı en yüksek direnci 288 ve 1270 no'lu izolatlar göstermiş olup yüzde canlılıkları sırasıyla % 93.98 ve 90.39 olarak tespit edilmiştir. En düşük dirence ise 675 (% 58.59) ve 24 (% 58.62) no'lu izolatların sahip olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.6: *Lactobacillus* suşlarının lizozim toleransı sonuçları

İzolat No	0. d	30. d		120. d	
	log kob/mL	log kob/mL	% canlılık	log kob/mL	% canlılık
665	$7.88\pm0.04^{a,A}$	$7.09\pm0.24^{ab,B}$	90.05	$6.16\pm0.15^{bc,C}$	78.14
1030	$7.65\pm0.18^{a,A}$	$6.17\pm0.19^{bcd,B}$	80.61	$5.36\pm0.17^{cd,C}$	69.98
1270	$7.71\pm0.41^{a,A}$	$7.11\pm0.04^{ab,A}$	92.12	$6.97\pm0.04^{ab,A}$	90.39
16	$7.80\pm0.16^{a,A}$	$6.46\pm0.07^{bc,B}$	82.73	$4.80\pm0.03^{def,C}$	61.49
184	$7.53\pm0.15^{a,A}$	$6.85\pm0.23^{b,A}$	90.91	$4.48\pm0.10^{f,B}$	59.47
15	$7.03\pm0.51^{a,A}$	$5.52\pm0.15^{cd,AB}$	78.59	$5.00\pm0.50^{def,B}$	71.23
449	$7.61\pm0.02^{a,A}$	$7.04\pm0.06^{ab,A}$	92.58	$4.98\pm0.37^{def,B}$	65.45
24	$7.47\pm0.22^{a,A}$	$5.19\pm0.07^{d,B}$	69.47	$4.38\pm0.10^{f,C}$	58.63
480	$7.52\pm0.10^{a,A}$	$5.78\pm0.68^{cd,B}$	76.90	$5.34\pm0.18^{cde,B}$	71.01
675	$7.68\pm0.01^{a,A}$	$5.31\pm0.04^{d,B}$	69.13	$4.50\pm0.07^{ef,C}$	58.59
288	$7.92\pm0.07^{a,A}$	$7.87\pm0.21^{a,A}$	99.43	$7.44\pm0.01^{a,A}$	93.98

Verilen değerler 2 tekerrürün aritmetik ortalamasıdır ve aritmetik ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir.
Önemli farklılıklar Tukey testi ile $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir.
Aynı sütundaki istatistiki farklılıklar küçük harf ile; aynı satırdaki istatistiki farklılıklar büyük harf ile ifade edilmiştir.
% canlılık, log kob/mL üzerinden hesaplanmıştır.

Enterococcus suşları arasında 120 dk sonunda lizozime karşı en yüksek direnç, sırasıyla % 86.47 ve 83.20 canlılık oranına sahip olan 1078 ve 894 no'lu izolatlarda belirlenmiştir. Tablo 4.7 incelendiğinde, 1041 no'lu izolatın 30 dk'nın sonunda % 71.82 ve 120 dk'nın sonunda % 60.44 canlılık oranı göstererek diğer enterokok izolatlarına göre daha düşük dirence sahip olduğu görülmektedir.

Tablo 4.7: *Enterococcus* suşlarının lizozim toleransı sonuçları

İzolat No	0. d	30. d		120. d	
	log kob/mL	log kob/mL	% canlılık	log kob/mL	% canlılık
99	$7.54\pm0.05^{a,A}$	$6.29\pm0.11^{bc,B}$	83.41	$6.05\pm0.08^{ab,B}$	80.23
12	$7.55\pm0.07^{a,A}$	$6.18\pm0.42^{bc,B}$	81.79	$5.39\pm0.12^{bc,B}$	71.32
277	$7.33\pm0.27^{a,A}$	$6.25\pm0.38^{bc,AB}$	85.27	$5.72\pm0.23^{abc,B}$	78.04
894	$7.89\pm0.02^{a,A}$	$6.69\pm0.16^{ab,A}$	84.78	$6.56\pm0.59^{a,A}$	83.20
702	$7.71\pm0.13^{a,A}$	$6.44\pm0.04^{bc,B}$	83.58	$5.90\pm0.21^{abc,B}$	76.51
382	$7.57\pm0.04^{a,A}$	$6.28\pm0.06^{bc,B}$	82.96	$5.57\pm0.20^{abc,C}$	73.58
1041	$7.95\pm0.06^{a,A}$	$5.71\pm0.17^{c,B}$	71.82	$4.81\pm0.06^{c,C}$	60.44
394	$7.79\pm0.04^{a,A}$	$7.55\pm0.13^{a,A}$	96.92	$6.29\pm0.11^{ab,B}$	80.73
1078	$7.43\pm0.17^{a,A}$	$7.43\pm0.17^{a,A}$	100.0	$6.43\pm0.46^{ab,A}$	86.47
1050	$7.51\pm0.68^{a,A}$	$6.30\pm0.37^{bc,AB}$	83.82	$4.88\pm0.16^{c,B}$	64.91

Verilen değerler 2 tekerrürün aritmetik ortalamasıdır ve aritmetik ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir.
Önemli farklılıklar Tukey testi ile $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir.
Aynı sütundaki istatistiki farklılıklar küçük harf ile; aynı satırdaki istatistiki farklılıklar büyük harf ile ifade edilmiştir.
% canlılık, log kob/mL üzerinden hesaplanmıştır.

Streptokokların bu çalışmada incelenen LAB'lar arasında lizozime karşı en yüksek direnç gösteren grup olduğu söylenebilir. *Streptococcus* suşlarının lizozim içeren ortamda 120 dk sonra belirlenen canlılık oranları % 84.20-93.06 arasında değişmekle birlikte en yüksek dirence 120 no'lu izolatın sahip olduğu belirlenmiştir.

Lizozim bakteri hücre duvarını parçalayarak bakteri hücresinin ölmesine veya zarar görmesine yol açmaktadır. Probiyotik bakterilerin bağırsağa canlı ulaşıp yarar sağlaması için lizozim gibi ağız boşluğunda bulunan enzimlere karşı dirençli olması gerekmektedir (Ayyash ve ark., 2018). Zago ve ark. (2011) 100 µg/mL lizozim içeren ortamda inceledikleri LAB'ların canlılığının % 3.24-99.97 arasında değiştiğini ve referans probiyotik suşun % 95.98 canlılık gösterdiğini belirtmiştir. Ayrıca Rajoka ve ark. (2017) yaptığı çalışmada laktik asit bakterilerinin lizozim toleransını mevcut çalışmada test edilenler ile benzer bulmuş olup şuşların canlı kalabilirlik oranını % 49.60-91.00 arasında tespit etmiştir.

Yapılan bu tez çalışmasında *Streptococcus* spp hücre duvarlarının lizozimden daha az etkilendiği; 665, 1270, 288 no'lu laktobasil ve 99, 894, 394, 1078 no'lu enterokok izolatlarınında daha yüksek direnç gösterdiği belirlenmiştir.

Tablo 4.8: *Streptococcus* suşlarının lizozim toleransı sonuçları

İzolat No	0. d	30. d		120. d	
	log kob/mL	log kob/mL	% canlılık	log kob/mL	% canlılık
1046	$8.90\pm0.16^{a,A}$	$8.33\pm0.25^{a,AB}$	93.59	$7.98\pm0.14^{a,B}$	89.71
932	$7.80\pm0.29^{c,A}$	$7.67\pm0.11^{b,A}$	98.33	$7.06\pm0.10^{ab,A}$	90.57
120	$8.65\pm0.30^{ab,A}$	$8.34\pm0.06^{a,A}$	96.36	$8.05\pm0.28^{a,A}$	93.06
930	$7.59\pm0.17^{c,A}$	$7.39\pm0.06^{b,A}$	97.30	$7.02\pm0.16^{ab,A}$	92.49
937	$7.83\pm0.18^{bc,A}$	$7.17\pm0.19^{b,A}$	91.51	$7.03\pm0.35^{ab,A}$	89.72
1191	$7.70\pm0.31^{c,A}$	$7.30\pm0.16^{b,A}$	94.81	$6.52\pm0.47^{b,A}$	84.68
375	$7.80\pm0.03^{bc,A}$	$7.60\pm0.04^{b,A}$	97.44	$6.78\pm0.25^{b,B}$	86.92
1214	$7.57\pm0.11^{c,A}$	$7.47\pm0.18^{b,A}$	98.74	$6.37\pm0.23^{b,B}$	84.20

Verilen değerler 2 tekerrürün aritmetik ortalamasıdır ve aritmetik ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir.
Önemli farklılıklar Tukey testi ile $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir.
Aynı sütundaki istatistiki farklılıklar küçük harf ile; aynı satırdaki istatistiki farklılıklar büyük harf ile ifade edilmiştir.
% canlılık, log kob/mL üzerinden hesaplanmıştır.

4.3.2. Safra ve asit toleransı sonuçları ve tartışma

Bu çalışmada LAB izolatlarının % 0.06, 0.125, 0.25, 0.5 ve 1 oranlarında safraya karşı dirençleri ve pH'sı 2 ve 3 olan ortamda asit toleransları test edilmiş olup ilgili sonuçlar Tablo 4.9, 4.10 ve 4.11'de verilmiştir.

Sonuçlar incelendiğinde genel olarak tüm izolatlarda safra oranının artışına bağlı olarak canlılık oranlarında düşme eğilimi görülmektedir. % 1 safra oranında 184 no'lu laktobasil izolatı % 56.86 ile *Lactobacillus* spp. arasında en düşük canlılık oranına sahipken 15 no'lu izolat % 76.62 oranında yüksek bir canlılık göstermiştir.

Elde edilen sonuçlara göre % 1 safrada 99, 894 ve 277 no'lu enterokok izolatları sırasıyla % 88.03, 87.47 ve 86.96 hayatta kalma oranları ile diğer enterokok izolatlarına göre daha iyi direnç göstermiştir.

Tablo 4.11'e bakıldığında streptokokların 24 saat sonunda % 1 safra içeren ortamda hayatta kalma oranları % 68.39-90.68 arasında değişmektedir.

LAB'ların asit toleransına ait sonuçlar incelendiğinde enterokok ve streptokok izolatlarının hiçbiri pH 2'de 2 saat sonunda canlılıklarını koruyamazken *Lactobacillus* spp.'de 1270, 1030 ve 288 haricinde geri kalan 8 izolat pH 2'de canlı kalabilmiştir. Canlılığını koruyan laktobasil suşlarının hücre yoğunluklarında 2 saat sonunda 0.43-3.91 log kob/ml arasında düşme görülmüş olup 16, 15 ve 675 no'lu laktobasil izolatları sırasıyla % 94, % 93 ve % 90 canlı kalma oranıyla pH 2'ye karşı en yüksek direnci göstermiştir.

LAB'ların pH 3'e karşı dirençleri incelendiğinde genel olarak *Lactobacillus* izolatları yüksek oranda canlı kalabilirlik göstermiş ve 2 saat sonunda hücre yoğunluğundaki azalma 0.42-1.71 log kob/mL arasında tespit edilmiştir.

Enterococcus spp.'de 4 izolat (277, 894, 702 ve 394) pH 3'te 2 saat sonrasında canlılığını korumuş olup bu 4 izolatın canlılık oranları % 47.55-80.97 arasında değişmekterdir.

Streptococcus spp.'de 930, 937, 1191 ve 375 no'lu izolatlar pH 3'te canlı kalamazken diğer 4 streptokok izolatının (1046, 930, 120 ve 1214) 2 saat sonraki canlılık oranları % 46.61-96.64 arasında değişmektedir.

Tablo 4.9: *Lactobacillus* suşlarının safra ve asit toleransı sonuçları

İzolat No	Safra toleransı (% canlılık)					Asit Toleransı (log kob/mL)*					
						pH 2			pH 3		
	% 0.06	% 0.125	% 0.25	% 0.50	% 1	0. s	2. s	% canlılık	0. s	2. s	% canlılık
665	97.59±2.56^{a,A}	83.15±3.65^{cde,B}	79.80±0.38^{abc,BC}	73.09±0.46^{ab,CD}	66.68±0.93^{abc,D}	7.11±0.04^{ab}	3.20±0.17^{c}	44.99	7.64±0.07^{a}	6.33±0.29^{ab}	82.83
1030	96.27±1.29^{ab,A}	95.17±0.48^{ab,A}	81.67±2.49^{a,B}	81.82±11.11^{ab,B}	75.51±0.03^{a,B}	7.49±0.02^{a}	0.00±0.00^{d}	0	7.88±0.11^{a}	6.86±0.11^{ab}	87.03
1270	86.93±8.31^{d,A}	85.82±8.74^{de,A}	80.41±1.73^{abcd,A}	79.05±2.65^{ab,A}	65.43±12.22^{bcd,B}	7.60±0.23^{a}	0.00±0.00^{d}	0	7.86±0.10^{a}	6.15±0.08^{ab}	78.24
16	95.57±2.55^{ab,A}	92.57±4.57^{abc,A}	89.81±3.60^{a,A}	70.24±8.32^{ab,B}	64.53±1.37^{abcd,B}	7.51±0.16^{a}	7.08±0.44^{a}	94.28	7.74±0.21^{a}	7.32±0.23^{ab}	94.58
184	86.08±2.84^{cd,A}	72.90±3.55^{e,AB}	67.58±6.87^{bcd,AB}	61.02±1.40^{b,B}	56.86±6.41^{cd,B}	7.50±0.06^{a}	4.17±0.03^{bc}	55.55	7.70±0.19^{a}	6.31±0.77^{ab}	81.98
15	95.54±3.28^{ab,A}	95.16±2.20^{abc,A}	78.33±5.09^{abcd,B}	77.08±1.26^{a,B}	76.62±6.27^{a,B}	7.33±0.04^{ab}	6.82±0.75^{a}	93.07	7.60±0.05^{a}	7.04±0.08^{b}	92.70
449	88.98±0.20^{bc,A}	83.53±5.65^{bcde,A}	65.62±1.77^{d,B}	63.06±1.16^{ab,BC}	58.09±8.57^{d,C}	6.94±0.05^{b}	3.24±0.11^{c}	46.74	7.71±0.39^{a}	6.34±0.13^{ab}	82.17
24	93.26±7.79^{cd,A}	77.75±2.31^{de,B}	66.57±0.83^{cd,C}	68.72±6.05^{ab,D}	61.80±2.91^{cd,E}	7.51±0.16^{a}	4.54±0.26^{b}	60.50	8.17±0.03^{a}	7.22±0.14^{a}	88.42
480	98.01±1.80^{a,A}	85.85±2.44^{abcd,B}	85.10±1.95^{a,B}	73.92±2.07^{ab,C}	69.34±0.07^{abc,C}	7.34±0.06^{ab}	3.72±0.36^{bc}	50.64	7.69±0.07^{a}	6.44±0.29^{ab}	83.71
675	99.32±0.90^{a,A}	93.10±5.65^{a,A}	86.78±8.65^{ab,B}	76.45±12.56^{ab,C}	75.26±12.21^{abcd,D}	7.47±0.12^{ab}	6.72±0.30^{a}	90.05	8.18±0.03^{a}	7.07±0.09^{ab}	86.43
288	96.44±0.51^{a,A}	91.81±3.24^{abc,A}	84.52±4.75^{a,AB}	78.01±7.95^{a,AB}	72.52±4.32^{ab,B}	7.43±0.28^{ab}	0.00±0.00^{d}	0	7.84±0.20^{a}	6.32±0.11^{ab}	80.55

Verilen değerler 2 tekerrürün aritmetik ortalamasıdır ve aritmetik ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir.
Önemli farklılıklar Tukey testi ile $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir.
Aynı sütundaki istatistiki farklılıklar küçük harf ile; aynı satırdaki istatistiki farklılıklar büyük harf ile ifade edilmiştir.
*% canlılık, log kob/mL üzerinden hesaplanmıştır.

Tablo 4.10: *Enterococcus* suşlarının safra ve asit toleransı sonuçları

İzolat No	Safra toleransı (% canlılık)					Asit Toleransı (log kob/mL)*					
						pH 2			pH 3		
	% 0.06	% 0.125	% 0.25	% 0.50	% 1	0. s	2. s	% canlılık	0. s	2. s	% canlılık
99	95.24±0.03^{ab,A}	92.96±0.02^{a,AB}	90.73±0.01^{abc,BC}	88.49±0.04^{ab,C}	88.03±0.03^{a,C}	5.16±0.05^{b}	0.00±0.00^{a}	0	7.26±0.00^{a}	0.00±0.00^{e}	0
12	97.53±0.27^{a,A}	98.06±3.74^{a,A}	94.38±1.15^{a,AB}	89.79±0.09^{ab,BC}	85.27±0.07^{abc,C}	3.61±0.06^{e}	0.00±0.00^{a}	0	6.99±0.00^{a}	0.00±0.00^{e}	0
277	96.67±0.55^{ab,A}	96.30±0.57^{a,A}	93.86±1.84^{ab,AB}	89.67±1.87^{ab,BC}	86.96±1.17^{ab,C}	0.00±0.00^{g}	0.00±0.00^{a}	0	7.25±0.02^{a}	4.40±0.01^{c}	60.66
894	95.43±0.53^{ab,A}	95.00±0.88^{a,A}	93.58±0.93^{ab,AB}	91.04±0.12^{a,BC}	87.47±1.51^{a,C}	4.06±0.04^{c}	0.00±0.00^{a}	0	6.38±0.68^{ab}	5.17±0.02^{a}	80.97
702	93.85±1.87^{ab,A}	85.29±1.11^{c,AB}	79.79±1.70^{d,AB}	78.83±3.24^{c,B}	77.25±7.01^{bcd,B}	3.22±0.08^{f}	0.00±0.00^{a}	0	6.43±0.18^{ab}	3.06±0.02^{d}	47.56
382	89.18±1.38^{b,A}	84.77±0.92^{c,AB}	82.02±4.63^{cd,AB}	78.11±1.81^{c,AB}	80.73±1.80^{abcd,B}	3.82±0.01^{d}	0.00±0.00^{a}	0	0.00±0.00^{d}	0.00±0.00^{e}	0
1041	97.10±4.74^{a,A}	85.77±0.55^{c,B}	85.34±1.55^{abcd,B}	77.47±2.59^{c,B}	76.09±2.47^{cd,B}	0.00±0.00^{g}	0.00±0.00^{a}	0	5.60±0.07^{b}	0.00±0.00^{e}	0
394	96.30±0.58^{ab,A}	86.44±0.56^{bc,B}	86.35±4.43^{abcd,B}	83.78±1.14^{bc,B}	78.33±0.35^{abcd,B}	0.00±0.00^{g}	0.00±0.00^{a}	0	6.45±0.00^{ab}	4.89±0.01^{b}	75.91
1078	93.08±2.88^{ab,A}	85.85±1.90^{c,AB}	77.69±3.15^{d,BC}	79.01±1.96^{c,BC}	75.58±0.35^{cd,C}	0.00±0.00^{g}	0.00±0.00^{a}	0	4.66±0.03^{c}	0.00±0.00^{e}	0
1050	91.21±0.16^{ab,A}	92.36±1.04^{ab,A}	83.09±3.53^{bcd,B}	79.71±1.20^{c,B}	70.85±1.51^{d,C}	5.76±0.03^{a}	0.00±0.00^{a}	0	6.97±0.00^{a}	0.00±0.00^{e}	0

Verilen değerler 2 tekerrürün aritmetik ortalamasıdır ve aritmetik ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir.
Önemli farklılıklar Tukey testi ile $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir.
Aynı sütundaki istatistiki farklılıklar küçük harf ile; aynı satırdaki istatistiki farklılıklar büyük harf ile ifade edilmiştir.
*% canlılık, log kob/mL üzerinden hesaplanmıştır.

Tablo 4.11: *Streptococcus* suşlarının safra ve asit toleransı sonuçları

İzolat No	Safra toleransı (% canlılık)					Asit Toleransı (log kob/mL)*					
						pH 2			pH 3		
	% 0.06	% 0.125	% 0.25	% 0.50	% 1	0. s	2. s	% canlılık	0. s	2. s	% canlılık
1046	93.48±1.42^{a,A}	83.22±0.93^{d,B}	83.42±1.63^{ab,B}	76.64±1.70^{bc,C}	68.39±1.51^{d,D}	6.01±0.04^{b}	0.00±0.00^{a}	0	6.91±0.01^{ab}	3.22±0.08^{c}	46.61
932	98.36±0.76^{a,A}	96.06±0.34^{a,A}	93.31±4.56^{a,A}	78.72±4.97^{abc,B}	72.33±3.90^{cd,B}	3.16±0.17^{f}	0.00±0.00^{a}	0	6.69±0.03^{b}	3.38±0.11^{c}	50.46
120	92.45±0.84^{a,A}	92.05±0.20^{abc,A}	82.98±1.96^{ab,B}	76.88±0.76^{bc,C}	77.67±2.34^{bc,BC}	6.66±0.01^{a}	0.00±0.00^{a}	0	7.19±0.11^{a}	3.73±0.14^{b}	51.93
930	95.96±0.25^{a,A}	85.87±2.40^{bcd,B}	80.56±0.36^{b,BC}	79.49±2.46^{abc,BC}	75.57±1.22^{bcd,C}	4.90±0.02^{c}	0.00±0.00^{a}	0	7.18±0.09^{a}	0.00±0.00^{d}	0
937	96.87±3.09^{a,A}	84.10±0.38^{cd,AB}	84.04±5.05^{ab,AB}	82.13±5.04^{abc,B}	82.73±0.70^{b,B}	4.52±0.05^{d}	0.00±0.00^{a}	0	5.89±0.24^{c}	0.00±0.00^{d}	0
1191	98.10±1.83^{a,A}	96.89±2.30^{a,A}	93.63±1.89^{a,A}	89.94±3.42^{a,A}	90.68±0.94^{a,A}	3.74±0.07^{e}	0.00±0.00^{a}	0	7.25±0.18^{a}	0.00±0.00^{d}	0
375	92.85±3.22^{a,A}	91.21±0.37^{abcd,A}	80.71±2.14^{b,B}	73.88±1.61^{c,BC}	71.87±1.70^{cd,C}	3.26±0.14^{f}	0.00±0.00^{a}	0	6.93±0.08^{ab}	0.00±0.00^{d}	0
1214	97.30±1.71^{a,A}	93.70±4.76^{ab,AB}	86.54±2.43^{ab,AB}	86.51±2.55^{ab,AB}	82.31±1.65^{b,B}	3.46±0.03^{ef}	0.00±0.00^{a}	0	6.95±0.06^{ab}	6.72±0.13^{a}	96.65

Verilen değerler 2 tekerrürün aritmetik ortalamasıdır ve aritmetik ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir.
Önemli farklılıklar Tukey testi ile $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir.
Aynı sütundaki istatistiki farklılıklar küçük harf ile; aynı satırdaki istatistiki farklılıklar büyük harf ile ifade edilmiştir.
*% canlılık, log kob/mL üzerinden hesaplanmıştır.

Probiyotik mikroorganizmaların bağırsakta hayatta kalabilmeleri için asit ve safra toleransına sahip olması gerekmektedir. 2-5 arasında değişen pH ve % 0.3-2 arasındaki safra tuzu konsantrasyonları, probiyotik mikroorganizmaların seçimi için kritik kabul edilmektedir. Nami ve ark. (2019) *Enterococcus* suşlarının asit ve safra toleransını incelemiş ve mevcut çalışmaya benzer sonuçlar elde etmiş olup; test edilen 32 enterokok izolatında pH 2.5'a karşı % 10-81.6 arasında, % 0.3 oranında sığır safrasına karşı % 9.1-79.8 arasında canlı kalabilirlik tespit etmiş ve hem safra hemde asit ortamda % 50'nin üzerinde canlılık gösteren 7 izolatı, probiyotik özelliklerini daha ayrıntılı incelemek için seçmişlerdir. Yine başka bir çalışmada Abushelaibi ve ark. (2017) deve sütünden izole edilen laktik asit bakterilerinin probiyotik potansiyelini incelemiş ve çalışmada referans propiyotik olarak *Lb. plantarum* DSM 2648 suşunu kullanmıştır. Referans suşun pH 2'de 2 saat sonrasında hücre yoğunluğunda 3.2 log kob/mL azalma olduğunu ve % 64 canlı kalabilirlik gösterdiğini belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda 15, 16 ve 675 no'lu laktobasil izolatları aynı koşullara daha iyi tolerans göstermiştir. Bununla birlikte Rajoka ve ark. (2017) yedi *Lb. rhamnosus* suşunun 3 saatlik inkübasyonun sonunda pH 2 de % 81 'in pH 3'te % 90'ın üzerinde canlılık gösterdiğini ve 7 izolattan 4'ünün % 1 safra içeren ortamda % 80'nin üzerinde canlılığını koruduğunu belirtmiştir. Son olarak streptokok ve laktobasil üzerinde yapılan bir çalışmada Zoumpopoulou ve ark. (2017) pH 2.5 seviyesinde laktobasillerin streptokoklara göre daha dirençli olduğunu ve *S. thermophilus* şuşlarının 2 saat sonrasında hücre yoğunluklarında 5 log kob/mL azalma görüldüğünü belirtmişlerdir. Tüm bunlar göz önüne alındığında bu çalışmada incelenen tüm laktobasil izolatları, 277, 894, 394 no'lu enterokok ve 932, 120, 1214 no'lu streptokok izolatları hem pH 3 hemde % 1 safraya karşı % 50'nin üzerinde canlı kalabilirlik oranına sahip olmakla birlikte ayrıca 16, 184, 15, 24, 480, 675 no'lu laktobasil izolatlarının pH 2'de % 50'nin üzerinde canlılığını koruyabildiği ve yukarıda verilen literatür sonuçları ile karşılaştırıldığında bu izolatların asit ve safra toleransı açısından probiyotik aday olabileceği düşünülmektedir.

4.3.3. Mide ve pankreas özsuyuna dayanıklılık sonuçları ve tartışma

Laktik asit bakterilerinin mide özsuyuna dirençlerini incelemek için lizozim (10 mg/L) ve pepsin (13.3 mg/L) içeren 2.5 pH'ya sahip ortam oluşturulmuş ve izolatların 3 saat sonundaki canlı hücre sayıları tespit edilmiştir. *Lactobacillus, Enterococcus* ve *Streptococcus* izolatlarına ait sonuçlar sırasıyla Tablo 4.12, 4.13 ve 4.14'te verilmiştir.

Tablo 4.12: *Lactobacillus* suşlarının mide ve pankreas özsuyu toleransı sonuçları (log kob/mL)

İzolat No	Mide özsuyu (pH 2.5)			Pankreas özsuyu (pH 8.0)		
	0. s	3. s	% canlılık	0. s	24. s	% canlılık
665	8.41±0.08^{cd}	7.20±0.06^{b}	85.60	9.63±0.01^{a}	7.64±0.02^{a}	79.32
1030	8.67±0.04^{abc}	8.48±0.03^{a}	97.86	9.44±0.02^{bc}	7.68±0.03^{a}	81.40
1270	8.02±0.09^{f}	5.28±0.03^{d}	65.88	9.23±0.00^{d}	7.50±0.28^{a}	81.26
16	8.35±0.02^{de}	5.47±0.13^{d}	65.55	9.43±0.01^{bc}	7.62±0.74^{a}	80.81
184	8.27±0.04^{def}	4.28±0.11^{e}	51.78	9.46±0.06^{b}	7.51±0.01^{a}	79.43
15	8.44±0.05^{bcd}	4.24±0.22^{e}	50.21	9.24±0.01^{d}	8.39±0.20^{a}	90.80
449	8.28±0.02^{def}	5.18±0.18^{d}	62.54	9.40±0.01^{bc}	8.25±0.07^{a}	87.81
24	8.79±0.02^{a}	5.91±0.06^{c}	67.27	9.36±0.02^{c}	7.72±0.06^{a}	82.52
480	8.87±0.16^{a}	8.52±0.06^{a}	96.05	9.46±0.01^{b}	7.73±0.04^{a}	81.66
675	8.71±0.08^{ab}	6.83±0.04^{b}	78.42	9.39±0.01^{bc}	7.54±0.01^{a}	80.30
288	8.12±0.01^{ef}	5.92±0.02^{c}	72.84	9.45±0.01^{bc}	7.79±0.01^{a}	82.48

Verilen değerler 2 tekerrürün aritmetik ortalamasıdır ve aritmetik ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir.
Önemli farklılıklar Tukey testi ile $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir.
Aynı sütundaki istatistiki farklılıklar küçük harf ile ifade edilmiştir.
% canlılık, log kob/mL üzerinden hesaplanmıştır.

Gastrik ortamda, *Lactobacillus* izolatları arasında diğerlerine göre daha düşük direnç gösteren 15 no'lu izolatın inkübasyonun başında hücre yoğunluğu 8.44 log kob/mL iken, 3 saatin sonunda bu değer 4.24 log kob/mL'ye düşmüştür ve izolat 15 canlılığını % 50'nin üzerinde korumuştur. Laktobasil izolatlarında en yüksek dirence sahip suşlar, sırasıyla % 97.87, 96.05 ve 85.60 canlılık oranına sahip 1030, 480 ve 665 no'lu izolatlardır.

Tablo 4.13: *Enterococcus* suşlarının mide ve pankreas özsuyu toleransı sonuçları (log kob/mL)

İzolat No	Mide özsuyu (pH 2.5)			Pankreas özsuyu (pH 8.0)		
	0. s	3. s	% canlılık	0. s	24. s	% canlılık
99	9.35±0.03^{bc}	5.37±0.14^{bc}	57.43	8.94±0.01^{c}	9.07±0.00^{a}	101.4
12	9.51±0.01^{ab}	4.71±0.06^{de}	49.50	9.15±0.01^{b}	9.03±0.01^{a}	98.58
277	9.31±0.03^{c}	5.63±0.13^{b}	60.47	9.15±0.01^{b}	8.40±0.01^{d}	91.86
894	9.64±0.08^{a}	5.51±0.06^{bc}	57.14	8.68±0.03^{e}	8.63±0.01^{c}	99.37
702	9.52±0.04^{ab}	5.09±0.23^{cd}	53.44	9.31±0.01^{a}	8.78±0.03^{b}	94.31
382	9.38±0.04^{bc}	4.49±0.13^{ef}	47.89	8.75±0.01^{de}	8.54±0.10^{d}	97.60
1041	9.51±0.08^{ab}	4.81±0.02^{de}	50.55	9.33±0.03^{a}	8.96±0.01^{a}	96.03
394	9.62±0.01^{a}	6.18±0.14^{a}	64.27	8.80±0.01^{d}	8.71±0.01^{bc}	98.98
1078	9.37±0.05^{bc}	6.36±0.16^{a}	67.91	8.93±0.04^{c}	8.62±0.03^{c}	96.58
1050	9.53±0.07^{ab}	4.00±0.05^{f}	41.92	8.81±0.01^{d}	8.25±0.02^{e}	93.59

Verilen değerler 2 tekerrürün aritmetik ortalamasıdır ve aritmetik ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir.
Önemli farklılıklar Tukey testi ile $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir.
Aynı sütundaki istatistiki farklılıklar küçük harf ile ifade edilmiştir.
% canlılık, log kob/mL üzerinden hesaplanmıştır.

Bu çalışmada değerlendirilen enterokoklar laktobasillere göre gastrik koşullara daha düşük bir direnç göstermiştir. Tablo 4.13'e bakıldığında izolat 1050 (% 41.92)

enterokoklar arasında en düşük dirence sahip iken izolat 1078 (% 67.91) en yüksek dirence sahiptir.

Gastrik koşullara karşı 3 saatin sonunda streptokok izolatlarının canlılık oranları % 31.66-61.24 arasında değişirken % 50'nin üzerinde canlı kalabilen tek izolat 930'dur. Tablo 4.14'ten anlaşılacağı üzere bu tez çalışmasında değerlendirilen tüm LAB izolatları arasında en düşük direnç gösteren izolatlar streptokoklara ait olup, 3 saatin sonunda sırasıyla % 31.66, 31.93, 33.45 oranında canlı kalabilen 1046, 932 ve 937 no'lu izolatlardır.

Tablo 4.14: *Streptococcus* suşlarının mide ve pankreas özsuyu toleransı sonuçları (log kob/mL)

İzolat No	Mide özsuyu (pH 2.5)			Pankreas özsuyu (pH 8.0)		
	0. s	3. s	% canlılık	0. s	24. s	% canlılık
1046	9.54±0.03^{a}	3.02±0.03^{c}	31.66	8.89±0.02^{ab}	8.48±0.04^{c}	95.39
932	9.52±0.04^{a}	3.04±0.04^{c}	31.93	8.50±0.52^{ab}	8.29±0.01^{d}	97.59
120	9.16±0.08^{b}	3.25±0.08^{c}	35.45	8.46±0.01^{b}	8.62±0.02^{b}	101.8
930	8.66±0.01^{c}	5.30±0.03^{a}	61.24	9.05±0.00^{ab}	8.89±0.02^{a}	98.18
937	9.45±0.08^{a}	3.16±0.17^{c}	33.46	9.07±0.04^{ab}	8.89±0.01^{a}	98.02
1191	9.43±0.02^{a}	3.30±0.20^{c}	35.01	9.11±0.01^{ab}	8.80±0.01^{a}	96.60
375	9.57±0.04^{a}	4.48±0.08^{b}	46.84	9.21±0.01^{a}	8.11±0.04^{e}	88.00
1214	9.19±0.03^{b}	3.37±0.07^{c}	36.67	9.14±0.03^{ab}	8.61±0.03^{b}	94.20

Verilen değerler 2 tekerrürün aritmetik ortalamasıdır ve aritmetik ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir.
Önemli farklılıklar Tukey testi ile $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir.
Aynı sütundaki istatistiki farklılıklar küçük harf ile ifade edilmiştir.
% canlılık, log kob/mL üzerinden hesaplanmıştır.

Mevcut tez çalışmasında laktik asit bakterilerinin pankreas özsuyuna dirençlerini incelemek amacıyla pankreatin (0.1 g/L) ve safra (3 g/L) içeren 8.0 pH'ya sahip ortam oluşturulmuş ve izolatların 24 saat sonundaki canlı kalabilirliği tespit edilmiştir. *Lactobacillus, Enterococcus* ve *Streptococcus* izolatlarına ait sonuçlar sırasıyla Tablo 4.12, 4.13 ve 4.14'te verilmiştir.

Lactobacillus, Enterococcus ve *Streptococcus* suşlarının pankreatik ortamda 24 saat sonundaki hücre yoğunlukları sırasıyla 7.50-8.39, 8.25-9.07 ve 8.11-8.89 log kob/mL arasında bulunmuş olup tüm izolatlar % 80'in üzerinde canlı kalabilirlik sergilemiş ve LAB izolatlarının pankreatik ortama karşı oldukça dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Tüketildikten sonra, probiyotik mikroorganizmalar midede (düşük pH, mide özsuyu ve pepsin) ve bağırsaklarda (pankreatin ve safra tuzları) antimikrobiyal faktörler

ile karşılaşır (de Melo Pereira ve ark., 2018). Besinlerin sindirim sisteminden geçişi sırasında, midede kalma süresi ortalama 3 saat olup bu sürede mide ortamının pH'sı 1-4 arasında değişmektedir (Vinderola ve Reinheimer, 2003). Bağırsaktaki safra tuzunun fizyolojik konsantrasyonu % 0.3-0.5 arasındadır. Laktik asit bakterilerinin ince bağırsak koşullarında *in vitro* direnç düzeylerinin belirlendiği safra tuzu (% 0.3) ve pankreatin (pH 8.0) uygulaması, probiyotik mikroorganizmaların tanımlanmasında kritik önem taşımaktadır (Uymaz, 2009).

Adesulu-Dahunsi ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada probiyotik aday olarak önerdikleri 3 laktik asit bakteri izolatının gastrik ortamda 3 saat sonraki canlı hücre sayılarını 6.27, 5.41 ve 5.59 log kob/mL olarak belirlemiştir. Öte yandan Santos ve ark. (2015) probiyotik özellikleri inceledikleri iki *Ent. faecium* suşunun gastrik ortamda hücre sayılarında 3.98 ve 3.03'lük bir azalma gösterdiklerini ve 1 saat sonrasındaki hücre sayılarının yaklaşık 4 log kob/mL olarak tespit ettiklerini belirtmişlerdir ve bu iki suşun iyi birer probiyotik aday olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu tez çalışmasında incelenen enterokok izolatları da gastrik ortamda benzer sonuçlar vermiştir.

Ayrıca Zago ve ark. (2011) gastrik geçiş sırasında gastrik suyun *Lb. plantarum* suşları üzerine etkilerini incelemiştir. Çalışmada referans probiyotik olarak kullandıkları *Lb. plantarum* ATCC 14917 suşunun gastrik ortama 9.10 log kob/mL canlı hücre sayısı ile girdiğini ve 90 dk sonrasında pH 2.2'de canlı hücre sayısının 2.81 log kob/mL'ye düştüğünü pankreatik ortamda ise canlı hücre sayısının 2.87 log kob/mL olduğunu belirtmiştir. Probiyotik suşların sağlık açısından fayda sağlaması için, insan GI sisteminin ekstrem koşullarına dayanması ve canlı ve aktif bir biçimde kolona ulaşması gerekmektedir. Bu amaçla çalışmada elde edilen veriler Zago ve ark. (2011)'nın sonuçları ile karşılaştırıldığında, araştırmada kullanılan tüm izolatların mide ve pankreatik ortamda referans probiyotik suştan daha iyi direnç gösterdiği gözlemlenmektedir. Vücuda alınan probiyotik mikroorganizmaların intestinal sisteme ulaşmadan önce midenin düşük pH'sında canlı kalması gerektiği göz önüne alındığında özellikle laktobasil izolatları, 99, 277, 894, 702, 1041, 394, 1078 no'lu enterokok izolatları ve 930 no'lu streptokok izolatı mide ortamında % 50'nin üzerinde canlılığını koruyarak diğer izolatlara göre daha iyi direnç göstermiştir.

4.3.4. Hidrofobisite ve otoagregasyon sonuçları ve tartışma

Laktik asit bakterilerinin hücre yüzeyi hidrofobisite özelliklerini değerlendirmek amacıyla hidrokarbon olarak n-hekzadekan ve ksilen kullanılmış olup *Lactobacillus, Enterococcus* ve *Streptococcus* izolatlarının hidrofobisite sonuçları sırasıyla Tablo 4.15, 4.16 ve 4.17'de verilmiştir.

Yapılan çalışmada *Lactobacillus* spp.'de 15, 24 ve 449 no'lu izolatlar hem n-hekzadekana hemde ksilene karşı yüksek hidrofobik özellik gösterdiği ve hidrofobisite değerlerinin sırasıyla n-hekzadekana karşı % 89.26, 75.56, 55.60 ve ksilene karşı % 93, 90.82, 72.53 olduğu tespit edilmiştir. Diğer 8 laktobasil izolatının hidrofobisite değerleri % 40'ın altında tespit edilmiştir.

Enterococcus spp.'de ise 99, 1041, 394 ve 1050 no'lu izolatlar n-hekzadekan (sırasıyla % 58.56, 76.48, 43.51 ve 51.21) ve ksilene (sırasıyla % 73.49, 76.14, 69.36 ve 79.31) karşı yüksek hidrofobik özellik sergilerken; 12, 277 ve 1078 no'lu izolatların sadece ksilene karşı (sırasıyla % 43.07, 77.50 ve 82.48) hidrofobik olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.15: *Lactobacillus* suşlarının % hidrofobisite ve % otoagregasyon sonuçları.

İzolat No	Hidrofobisite (%)		Otoagregasyon (%)	
	n-hekzadekan	ksilen	3. s	24. s
665	15.62±3.57^{d}	16.06±0.93^{b}	17.68±7.60^{a}	21.60±1.32^{a}
1030	20.67±0.03^{d}	6.41±3.37^{b}	7.88±3.05^{a}	16.21±2.59^{a}
1270	22.99±3.20^{d}	27.58±6.25^{b}	8.53±4.13^{a}	20.18±3.38^{a}
16	22.56±3.13^{d}	21.82±3.05^{b}	9.35±3.38^{a}	18.63±15.38^{a}
184	19.73±1.68^{d}	17.11±5.79^{b}	12.37±4.84^{a}	14.66±15.44^{a}
15	89.26±0.86^{a}	93.00±5.86^{a}	10.30±4.61^{a}	20.24±8.37^{a}
449	55.60±0.34^{c}	72.53±16.76^{a}	28.53±7.54^{a}	24.89±1.69^{a}
24	75.56±2.44^{b}	90.82±5.19^{a}	13.60±4.66^{a}	9.80±10.12^{a}
480	4.61±0.52^{e}	25.42±23.00^{b}	18.80±0.49^{a}	20.52±1.33^{a}
675	4.26±1.18^{e}	2.20±1.66^{b}	14.53±18.26^{a}	9.00±0.54^{a}
288	5.42±1.22^{e}	2.09±1.90^{b}	8.31±2.42^{a}	25.12±10.12^{a}

Verilen değerler 2 tekerrürün aritmetik ortalamasıdır ve aritmetik ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir.
Önemli farklılıklar Tukey testi ile $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir.
Aynı sütundaki istatistiki farklılıklar küçük harf ile ifade edilmiştir.

Tablo 4.17 incelendiğinde 8 streptokok izolatından 4 tanesi (1046, 930, 937 ve 1191) her iki hidrokarbona karşı iyi hidrofobik özellik göstermiş olup bu dört izolatın % hidrofobisite değerleri n-hekzadekana karşı 46.21-80.01 ve ksilene karşı 67.37-91.94 arasında bulunmuştur. 1214 no'lu streptokok izolatı sadece n-hekzadekana (% 50.74)

karşı yüksek hidrofobisite gösterirken diğer *Streptococcus* spp. için daha düşük hidrofobisite değerleri tespit edilmiştir.

Mikroorganizmaların bağırsak epitel hücrelerine adhezyonunda çeşitli mekanizmalar rol oynamaktadır (Savage, 1992). Mikroorganizmaların dış yüzeylerinin hidrofobik yapısı bakterilerin konakçı dokuya bağlanmasını etkilemektedir (Kiely ve Olson, 2000). Bu özellik insan gastrointestinal sisteminde bakteriye varlığını koruyabilmesi için önemli bir avantaj sağlamaktadır. Daha yüksek hidrofobiklik sergileyen bakteri hücrelerinin mukus veya epitel hücreleri ile güçlü etkileşim oluşturması beklenir (Vidhyasagar ve Jeevaratnam, 2013). Bununla birlikte bazı araştırmacılar hidrofobisitenin adhezyona yardımcı olduğunu ancak güçlü bir tutunma için ön koşul olmadığını belirtmişlerdir (Santos ve ark., 2015).

Tablo 4.16: *Enterococcus* suşlarının % hidrofobisite ve % otoagregasyon sonuçları.

İzolat No	Hidrofobisite (%)		Otoagregasyon (%)	
	n-hekzadekan	ksilen	3. s	24. s
99	58.56±2.06^{b}	73.49±3.64^{ab}	43.19±3.23^{a}	53.87±8.33^{a}
12	12.41±0.50^{ef}	43.07±2.28^{bc}	33.05±1.81^{a}	30.51±11.80^{ab}
277	18.23±4.16^{e}	77.50±0.24^{a}	27.18±13.9^{a}	23.21±3.54^{ab}
894	9.42±1.45^{f}	5.72±0.27^{d}	29.15±3.40^{a}	49.09±12.24^{a}
702	11.95±0.68^{ef}	14.63±5.84^{cd}	28.01±6.75^{a}	19.88±15.91^{ab}
382	17.91±3.11^{e}	35.23±0.39^{cd}	30.71±9.60^{a}	17.99±5.41^{ab}
1041	76.48±1.47^{a}	76.14±23.04^{a}	32.98±1.13^{a}	9.70±2.78^{b}
394	43.21±2.39^{c}	69.36±0.08^{ab}	17.78±5.16^{a}	10.66±1.15^{b}
1078	34.49±0.50^{d}	82.48±9.86^{a}	30.59±8.97^{a}	30.19±10.78^{ab}
1050	51.21±1.08^{bc}	79.31±3.94^{a}	15.87±17.1^{a}	34.52±10.57^{ab}

Verilen değerler 2 tekerrürün aritmetik ortalamasıdır ve aritmetik ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir.
Önemli farklılıklar Tukey testi ile $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir.
Aynı sütundaki istatistiki farklılıklar küçük harf ile ifade edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada Abushelaibi ve ark. (2017) *Lactobacillus* ve *Lactococcus* izolatlarının hidrofobisite özelliklerini değerlendirmiş ve bu izolatların n-hekzadekan ve ksilene karşı hidrofobisite değerlerini sırasıyla % 0.6-16.2 ve % 1.6-57.9 aralığında tespit etmiştir. Ayrıca referans probiyotik olarak kullandıkları *Lb. plantarun* DSM2848 suşunun n-hekzadekan ve ksilene karşı hidrofobisite değerlerini sırasıyla % 5.8 ve % 23 olarak tespit etmişlerdir. *Enterococcus* spp. ve *Strepococcus* spp. üzerine yapılan başka bir çalışmada Ayyash ve ark. (2018) n-hekzadekan ve ksilene karşı hidrofobisite değerlerini sırasıyla % 0.5-7.6 ve % 2.9-46.9 aralığında vermiş olup bu tez çalışmasında önceki araştırma sonuçlarına göre daha yüksek hidrofobisite değerlerine sahip suşlar tespit edilmiştir. Rajoka ve ark. (2017) probiyotik bir suş için gerekli hidrofobisite

değerinin en az % 40 olması gerektiğini belirtmiştir. Bu bağlamda yapılan bu çalışmada yüksek hidrofobisite değerlerine sahip 15, 449, 24, 99, 12, 277, 1041, 394, 1078, 1050, 1046, 930, 937, 1191 ve 1214 no'lu suşların güçlü hidrofobik etkileşimi yoluyla bağırsak epitel hücrelerine adhezyonunun gerçekleşeceği düşünülmektedir.

Çalışmada LAB izolatlarının otoagregasyon yeteneği inkübasyonun 3 ve 24. saatinde 60 nm'de spektorofotometrik ölçüm yapılarak hesaplanmış ve *Lactobacillus, Enterococcus* ve *Streptococcus* izolatlarının otoagregasyon yüzdeleri sırasıyla Tablo 4.15, 4.16 ve 4.17'de verilmiştir. LAB izolatlarının otoagregasyon değerleri 3 saat sonunda *Lactobacillus* spp. için % 7.88-28.53, *Enterococcus* spp. için % 15.87- 43.19 ve *Streptococcus* spp. için % 7.44-17.21 arasında değişirken 24. saatte bu değerler *Lactobacillus* spp. için % 9-25.12, *Enterococcus* spp. için % 9.70-53.87 ve *Streptococcus* spp. için 2.53-33.40 arasında tespit edilmiştir. 99, 12, 894, 1078, 1050, 1046, 375 no'lu izolatlar 24 saatin sonunda diğer izolatlara nazaran daha yüksek otoagregasyon özellik sergilemektedir.

Otoagregasyon yeteneği aynı suş hücrelerinin kümelenmesi olarak tanımlanmaktadır. Probiyotik mikroorganizmalar, patojenlere karşı avantaj sağlayan yığınlar oluşturabilir, böylece patojenlerin insan gastrointestinal sistemindeki adhezyon bölgelerine yapışmalarını engelleyebilirler (Gut ve ark., 2019). Otoagregasyon testi, probiyotik adayların epitel hücrelere veya mukozal yüzeylere yapışma kapasitesini, kolonizasyon ve biyofilm oluşumunu tespit etmek için önemlidir ve yüksek oto-agregasyon yüzdeleri bağırsak epitelinde yüksek adhezyon potansiyeli anlamına gelmektedir (Ben Braïek ve ark., 2018).

Tablo 4.17: *Streptococcus* suşlarının % hidrofobisite ve % otoagregasyon sonuçları.

İzolat No	Hidrofobisite (%)		Otoagregasyon (%)	
	n-hekzadekan	ksilen	3. s	24. s
1046	56.99±3.65^{ab}	67.97±4.16^{a}	17.37±8.74^{a}	33.40±2.63^{a}
932	10.54±2.02^{c}	38.71±3.76b	9.07±5.23^{a}	23.03±5.91^{ab}
120	20.33±1.29^{bc}	13.12±4.57^{b}	9.33±4.70^{a}	13.34±3.10^{ab}
930	46.21±1.84^{abc}	67.37±1.69^{a}	9.32±1.52^{a}	6.31±2.19^{b}
937	47.06±1.93^{abc}	88.23±1.08^{a}	17.21±1.97^{a}	11.86±3.01^{ab}
1191	80.01±1.96^{a}	91.94±3.56^{a}	8.87±4.72^{a}	7.50±8.75^{b}
375	27.22±0.87^{bc}	27.00±6.01^{b}	8.52±1.57^{a}	32.04±1.60^{a}
1214	50.74±4.87^{ab}	28.56±1.67^{b}	7.44±5.95^{a}	2.53±0.81^{b}

Verilen değerler 2 tekerrürün aritmetik ortalamasıdır ve aritmetik ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir.
Önemli farklılıklar Tukey testi ile $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir.
Aynı sütundaki istatistiki farklılıklar küçük harf ile ifade edilmiştir.

Daha önceden *Ent. lactis* suşlarının incelendiği bir çalışmada 5 saatlik inkübasyonun ardından otoagregasyon değerleri % 20-36 arasında belirlenmiş ve bu çalışmada % 33 ve % 36 otoagregasyon değerine sahip iki *Ent. lactis* suşunun etkili bir probiyotik olarak değerlendirilebileceği ileri sürülmüştür (Ben Braïek ve ark., 2018). Ayrıca Ayyash ve ark. (2018) enterokok ve streptokok suşlarının otoagregasyon değerlerini 3 ve 24 saatlik inkübasyonun ardından sırasıyla % 0.5-14.3 ve % 1.2-33.1 aralığında belirlemiştir ve yapmış olduğumuz bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. Yine Abushelaibi ve ark. (2017) referans probiyotik olarak kullandıkları *Lb. plantarun* DSM2848 suşunun 3 ve 24 saat inkubasyon sonrası otoagregasyon değerini % 4 ve % 14.8 olarak belirtmiştir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında bizim çalışmamızda incelenen 29 izolatın 21'inde probiyotik *Lb. plantarun* DSM2848 bakterisine göre daha yüksek otoagregasyon değerleri tespit edilmiştir. Özellikle 99 (% 53.87) ve 894 (% 49.09) no'lu enterokok izolatları çalışmada incelediğimiz izolatlar arasında en yüksek otoagregasyon yüzdesi göstermiş olup bu izolatların hücre yığınları oluşturarak patojen mikoorganizmaların epitel dokuya tutunmasının engellenmesinde daha etkili olacağı düşünülmektedir.

4.3.5. Antibakteriyal aktivite sonuçları ve tartışma

Çalışma kapsamında LAB izolatlarının genel antibakteriyal aktivitelerini belirlemek için 5 adet indikatör mikroorganizma seçilmiştir. Laktik asit bakterilerinin bu indikatör mikroorganizmalar üzerindeki inhibisyon etkileri test edilmiş ve oluşturdukları inhibisyon zon çapları ölçülmüştür (Şekil 4.2). Bu amaçla patojen bakteri olarak *Salm.* Typhimurium ATCC 14028, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *Staph. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC 11778 ve *E. coli* ATCC 25922 kullanılmıştır. *Lactobacillus, Enterococcus* ve *Streptococcus* izolatlarına ait antibakteriyal aktivite sonuçları sırasıyla Tablo 4.18, 4.19 ve 4. 20'de verilmiştir.

16, 184 ve 375 dışında tüm LAB izolatları *Staph. aureus* ATCC 25923'a karşı antibakteriyal aktivite gösterirken 15 ve 449 no'lu laktobasil, 277, 894, 702, 1041 ve 394 no'lu enterokok ve 1046, 932 ve 375 no'lu streptokok izolatları *L.monocytogenes* ATCC 7644'e karşıda antibakteriyal aktivite göstermiştir. Elde edilen sonuçlara göre *B. cereus* ATCC 11778 'e karşı sadece 120 ve 930 no'lu streptokok ve *E. coli* ATCC

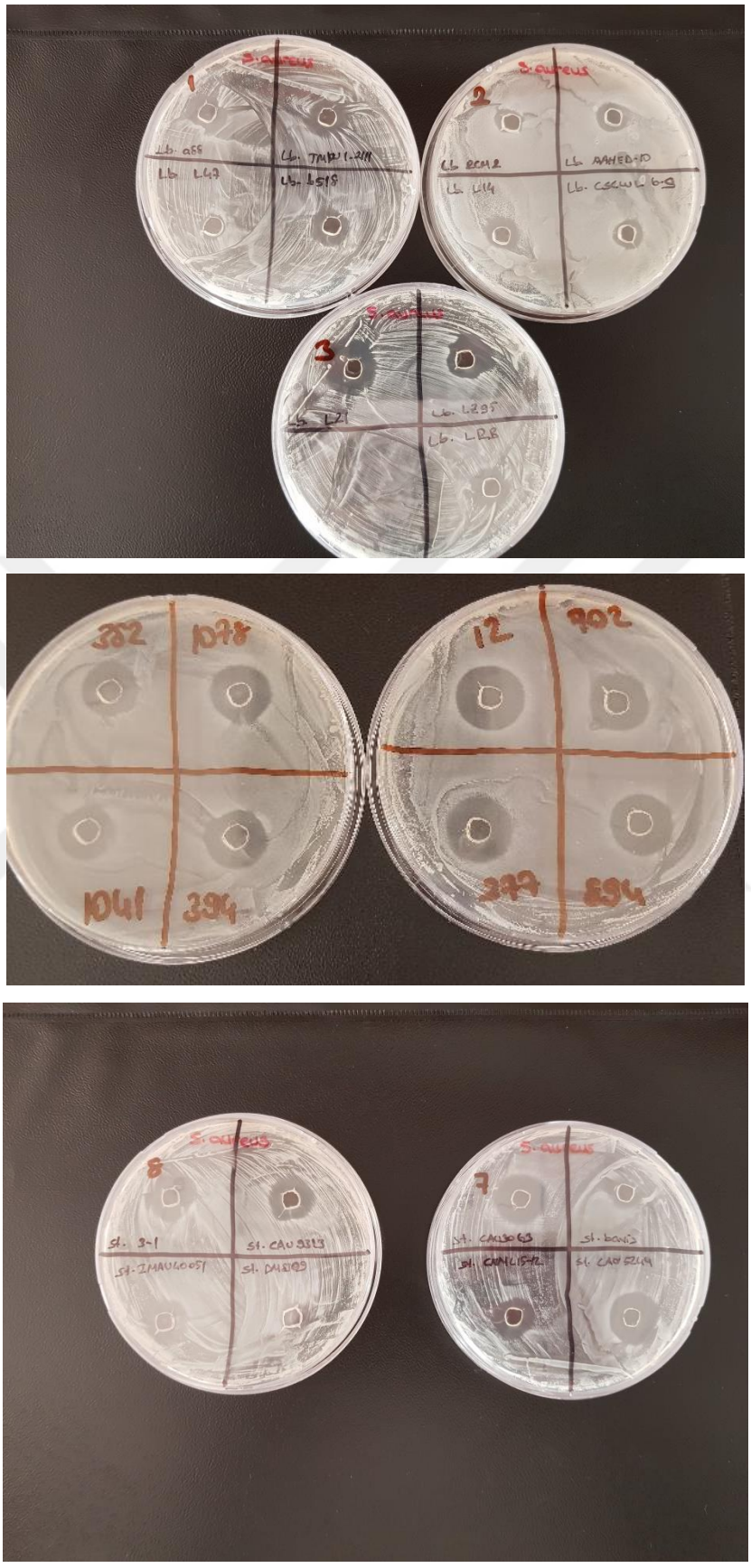
25922'e karşı sadece 675 no'lu laktobasil izolatı aktivite göstermiştir ve LAB suşlarının hiçbiri *Salm.* Typhimurium ATCC 14028'e karşı inhibisyon zonu vermemiştir.

Laktik asit bakterilerinin, bazı mikroorganizmaların gelişmeleri ve toksin üretmeleri üzerine güçlü bir inhibitör etkiye sahip oldukları bilinmektedir. Organik asitler (laktik ve asetik asitler) ve bakteriyosinler gibi antimikrobiyal maddelerin LAB tarafından üretimi, suş seçimi için probiyotik özelliklerden biri olarak bildirilmiştir (Fuller, 1989). Laktik asit bakterileri tarafından sergilenen antibakteriyal aktivite, gıdalarda veya GI geçiş sırasında istenmeyen mikrobiyotayı kontrol etmek için faydalı olabilir (Adesulu-Dahunsi ve ark., 2018). *Lb. plantarum* suşlarının incelendiği bir çalışmada Zago ve ark. (2011) indikatör mikroorganizma olarak *E. coli* V517, *Salm. enteritidis* OMS-Ca, *L. monocytogenes* ATCC 15313 ve *Staph. aureus* 76 kullanmış ve 27 adet *Lb. plantarum* izolatından hiç birinin bu patojenlere karşı antibakteriyal aktivite göstermediğini belirlemiştir. Başka bir çalışmada *Enterococcus* spp. ve *Streptococcus* spp. antibakteriyal aktivitesi incelenmiş ve 12 izolattan 3'ünün patojenlere karşı etkili olmadığı ve antibakteriyal aktivite gösteren izolartlarında bizim çalışmamızda olduğu gibi *Staph. aureus*'a karşı daha yüksek inhibisyon etkisi gösterdiği belirtilmiştir (Ayyash ve ark., 2018). Öte yandan García-Hernández ve ark. (2016) incelediği laktik asit bakterileri arasında probiyotik aday gösterdiği *Lb. pentosus* LB-31 izolatının 6 patojen mikroorganizmaya karşı 15 mm'nin üzerinde inhibisyon zonu oluşturduğunu bildirmiştir. Bizim çalışmamızda ise izolat 16 ve 184 dışında tüm izolatlar en az bir patojene karşı antibakteriyal aktivite göstermiş olup bu iki izolatta antibakteriyal aktiviteye rastlanmamıştır.

(a)

(b)

(c)



Şekil 4.2: *Lactobacillus* (a), *Enterococcus* (b), *Streptococcus* (c) izolatlarının *Stap. aureus* ATCC 25923 indikatör mikroorganizmaya karşı gösterdikleri antibakteriyal aktivitenin petri kutusundaki fotoğraf görüntüsü.

Tablo 4.18. *Lactobacillus* suşlarının antibakteriyal aktivite, bakteriyosin ve diasetil üretim sonuçları

İzolat No	Antibakteriyal Aktivite*					Bakteriyosin Üretimi**	Diasetil Üretimi**
	Salm. Typhimurium ATCC 14028	*L. monocytogenes* ATCC 7644	*Staph. aureus* ATCC 25923	*B. cereus* ATCC 11778	*E. coli* ATCC 25922		
665	0.00±0.00	0.00±0.00^{b}	15.00±0.00^{ab}	0.00±0.00	0.00±0.00	-	-
1030	0.00±0.00	0.00±0.00^{b}	12.50±0.71^{bcd}	0.00±0.00	0.00±0.00	-	-
1270	0.00±0.00	0.00±0.00^{b}	13.00±1.41^{bc}	0.00±0.00	0.00±0.00	-	+
16	0.00±0.00	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{f}	0.00±0.00	0.00±0.00	-	+++
184	0.00±0.00	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{f}	0.00±0.00	0.00±0.00	-	+
15	0.00±0.00	11.00±1.41^{a}	9.00±0.00^{e}	0.00±0.00	0.00±0.00	-	+
449	0.00±0.00	9.50±0.71^{a}	8.50±0.71^{e}	0.00±0.00	0.00±0.00	-	+
24	0.00±0.00	0.00±0.00^{b}	9.50±0.71^{de}	0.00±0.00	0.00±0.00	-	+
480	0.00±0.00	0.00±0.00^{b}	18.00±1.41^{a}	0.00±0.00	0.00±0.00	-	-
675	0.00±0.00	0.00±0.00^{b}	12.50±0.71^{bcd}	0.00±0.00	8.00±0.00	-	-
288	0.00±0.00	0.00±0.00^{b}	11.50±0.71^{cde}	0.00±0.00	0.00±0.00	-	+++

* Verilen değerler 2 tekerrürün aritmetik ortalamasıdır ve aritmetik ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir.
Önemli farklılıklar Tukey testi ile $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir.
Aynı sütundaki istatistiki farklılıklar küçük harf ile ifade edilmiştir.
**(-):üretim yok; (+):zayıf ; (++):orta; (+++):kuvvetli üretim

Tablo 4.19. *Enterococcus* suşlarının antibakteriyal aktivite, bakteriyosin üretimi ve diasetil üretim sonuçları

İzolat No	Antibakteriyal Aktivite*					Bakteriyosin Üretimi**	Diasetil Üretimi**
	***Salm.* Typhimurium ATCC 14028**	***L. monocytogenes* *ATCC 7644***	***Staph. aureus* ATCC 25923**	***B. cereus* ATCC 11778**	***E. coli* ATCC 25922**		
99	0.00±0.00	0.00±0.00^{c}	15.00±0.00^{ab}	0.00±0.00	0.00±0.00	-	+++
12	0.00±0.00	0.00±0.00^{c}	16.00±1.41^{a}	0.00±0.00	0.00±0.00	-	++
277	0.00±0.00	10.00±0.00^{b}	15.00±1.41^{ab}	0.00±0.00	0.00±0.00	-	++
894	0.00±0.00	10.50±0.71^{b}	13.00±0.00^{abc}	0.00±0.00	0.00±0.00	-	+
702	0.00±0.00	11.50±0.71^{ab}	11.00±0.00^{c}	0.00±0.00	0.00±0.00	-	++
382	0.00±0.00	0.00±0.00^{c}	12.50±0.71^{bc}	0.00±0.00	0.00±0.00	-	+++
1041	0.00±0.00	11.00±0.00^{ab}	7.50±0.71^{d}	0.00±0.00	0.00±0.00	-	++
394	0.00±0.00	12.50±0.71^{a}	11.00±1.41^{c}	0.00±0.00	0.00±0.00	-	+++
1078	0.00±0.00	0.00±0.00^{c}	13.50±0.71^{abc}	0.00±0.00	0.00±0.00	-	+++
1050	0.00±0.00	0.00±0.00^{c}	16.00±0.00^{a}	0.00±0.00	0.00±0.00	-	+

* Verilen değerler 2 tekerrürün aritmetik ortalamasıdır ve aritmetik ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir.
Önemli farklılıklar Tukey testi ile $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir.
Aynı sütundaki istatistiki farklılıklar küçük harf ile ifade edilmiştir.
**(-):üretim yok; (+):zayıf ; (++):orta; (+++):kuvvetli üretim

Tablo 4.20. *Streptococcus* suşlarının antibakteriyal aktivite, bakteriyosin üretimi ve diasetil üretim sonuçları

İzolat No	Antibakteriyal Aktivite*					Bakteriyosin Üretimi**	Diasetil Üretimi**
	***Salm.* Typhimurium ATCC 14028**	***L. monocytogenes ATCC 7644***	***Staph. aureus* ATCC 25923**	***B. cereus* ATCC 11778**	***E. coli* ATCC 25922**		
1046	0.00±0.00	10.50±0.71^{a}	15.50±0.71^{a}	0.00±0.00^{c}	0.00±0.00	-	++
932	0.00±0.00	11.00±0.00^{a}	7.00±0.00^{c}	0.00±0.00^{c}	0.00±0.00	-	+
120	0.00±0.00	0.00±0.00^{b}	15.50±0.71^{a}	12.00±0.00^{a}	0.00±0.00	-	+
930	0.00±0.00	0.00±0.00^{b}	12.00±0.00^{b}	10.00±1,41^{b}	0.00±0.00	-	++
937	0.00±0.00	0.00±0.00^{b}	12.50±0,71^{b}	0.00±0.00^{c}	0.00±0.00	-	++
1191	0.00±0.00	0.00±0.00^{b}	14.00±1.41^{ab}	0.00±0.00^{c}	0.00±0.00	-	+
375	0.00±0.00	12.00±1.41^{a}	0.00±0.00^{d}	0.00±0.00^{c}	0.00±0.00	-	+++
1214	0.00±0.00	0.00±0.00^{b}	13.50±0.71^{ab}	0.00±0.00^{c}	0.00±0.00	-	+++

* Verilen değerler 2 tekerrürün aritmetik ortalamasıdır ve aritmetik ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir.
Önemli farklılıklar Tukey testi ile $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir.
Aynı sütundaki istatistiki farklılıklar küçük harf ile ifade edilmiştir.
**(-):üretim yok; (+):zayıf ; (++):orta; (+++):kuvvetli üretim

4.3.6. Bakeriyosin üretimi sonuçları ve tartışma

LAB izolatlarının antibakteriyal etkilerinin bakteriyosin kaynaklı olup olmadığını belirlemek amacı ile antibakteriyal aktivite gösteren izolatlar santrifüj edildikten sonra nötralize edilmiş, enzim ile muamele edilmiş ve membran filtreden geçirilerek antibakteriyal aktivitesi test edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *Lactobacillus, Enterococcus* ve *Streptococcus* izolatlarının hiçbirinde bakteriyosin üretimi gözlemlenmemiş olup izolatların genel antibakteriyal etkilerinin asitlik veya diğer inhibitör maddelerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlarla benzer şekilde Ren ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada fermente gıdalardan izole ettikleri 36 adet *Lb. plantarum, Lb. paraplantarum* ve *Lb. carnosus* suşlarının gösterdiği antimikrobiyel etkinin bakteriyosinden kaynaklanmadığını, asitlik ve hidrojenperoksit kaynaklı olduğunu bildirmişlerdir.

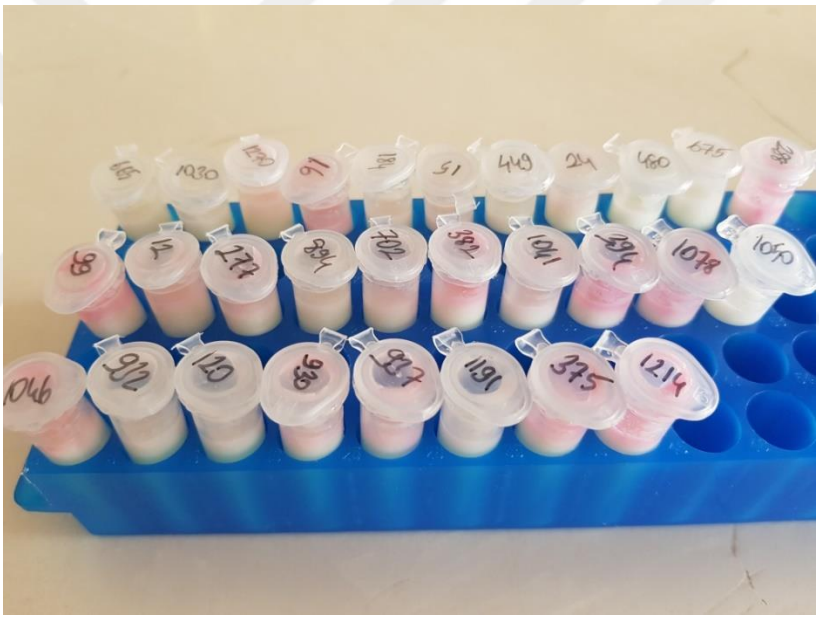
Oral (2015) insan ve gıda örneklerinden izole edilen ve karakterizasyonları yapılan laktik asit bakteri suşlarının bakteriyosin üretiminden sorumlu olup olmadıklarını belirlemek amacıyla 7 farklı indikatör bakteriye karşı nokta ekim yöntemi ile ekim yapıp 18 saat inkübasyon sonucunda inhibisyon zonunun oluşup oluşmadığına bakmış ve test edilen suşların arasından yalnızca *Pediococcus pentosaceus* OZH2 suşunun bakteriyosin aktivitesi gösterdiğini belirtmiştir.

Eken (2019) tez çalışmasında *Lb. sakei* suşlarının ürettiği antimikrobiyel maddenin protein yapısında olup olmadığını proteinaz K enzim uygulaması ile incelemiş ve *Lb. sakei* suşlarının hiçbirinin antimikrobiyel etkisinin proteinaz K enzim uygulamasından etkilenmediğini ve bu suşlar tarafından üretilen antimikrobiyel maddenin bakteriyosin dışında başka bir metabolitten kaynaklandığını ortaya koymuştur.

4.3.7. Diasetil üretimi sonuçları ve tartışma

LAB'lar tarafından üretilen antimikrobiyel metabolitlerden birisi de diasetildir. Mevcut tez çalışmasında incelenen *Lactobacillus, Enterococcus* ve *Streptococcus* izolatları diasetil üretimi açısından incelenmiş olup ilgili sonuçlar Tablo 4.18, 4.19 ve 4.20'de verilmiştir.

İncelenen suşların diasetil üretim sonuçlarına göre 665, 1030, 480 ve 675 no'lu laktobasil izolatları diasetil üretimi gerçekleştirmezken izolat 16 ve 288'de kuvvetli geri kalan izolatlarda zayıf diasetil üretimi gözlemlenmiştir. Enterokok ve streptokok izolatlarının hepsinde diasetil üretimi tespit edilmiş ancak 894, 1050, 932, 120 ve 1191'de zayıf diasetil üretimi gerçekleşmiştir. Elde edilen verilere göre 99, 382, 394 ve 1078 no'lu enterokoklar ile 375 ve 1214 no'lu streptokoklar kuvvetli diasetil üretim özelliği sergilemektedir (Şekil 4.3). İzolat 16 ve 184 antibakteriyal aktivite testinde patojenlere karşı inhibisyon zonu oluşturmamasına rağmen iki suşta da diasetil üretimi gözlenmiştir. Çon ve Gökalp (2000) laktik asit bakterileri tarafından üretilen diasetilin tek başına koruyucu etkide önemli rol oynamadığını ancak diğer metabolitler ile birlikte düşünüldüğünde önemli olabileceğini ifade etmiştir.

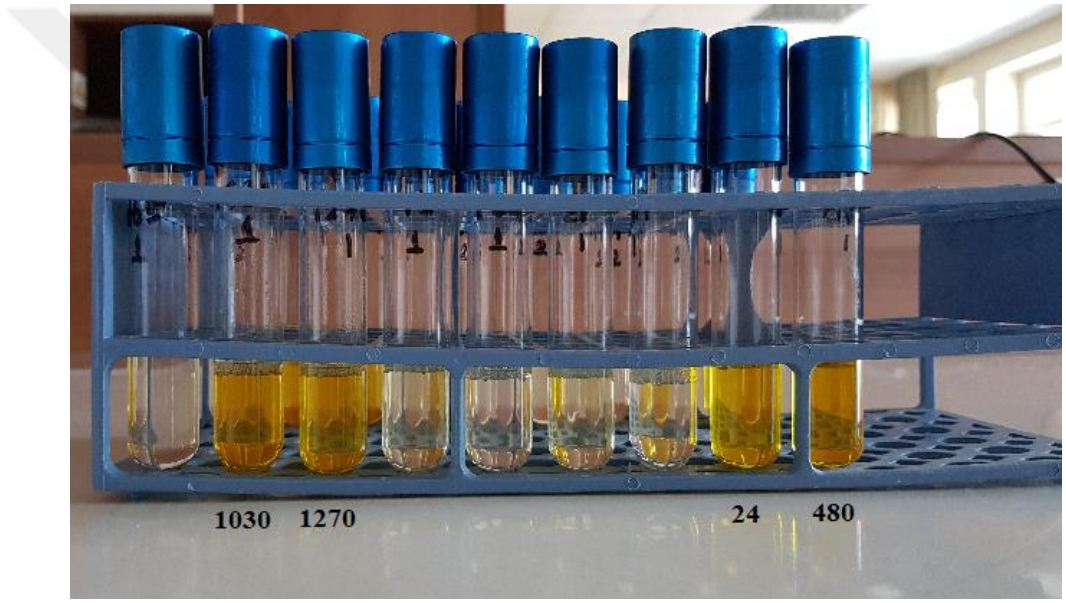


Şekil 4.3: Diasetil üretimi yapan laktik asit bakterilerinin tüpte oluşturdukları pembe renk görüntüsü

Yapılan bir çalışmada de Almeida Júnior ve ark. (2015) keçi sütünden izole ettikleri laktik asit bakterilerinin zayıf diasetil üretimi gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir. Diasetil (2,3-butanedione), belirli LAB tarafından üretilen sitrat metabolizmasının uçucu bir ürünü olup, bu ürünler tat ve aroma gelişimine doğrudan etki etmektedir. Tez çalışmamızda incelenen 29 laktik asit bakteri izolatından sadece 4 tanesinde (665, 1030, 480, 675) bu özellik tespit edilmemiştir ve diğer izolatların olgunlaşmış peynir, krema ve tereyağ gibi süt ürünlerinde yardımcı kültür olarak kullanımının lezzet gelişimine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

4.3.8. β-galaktosidaz aktivitesi sonuçları ve tartışma

LAB izolatlarının β-galaktosidaz aktivitesi şeker olarak glukoz yerine laktoz içeren besi ortamında test edilmiş olup elde edilen sonuçlar Tablo 4.21, 4.22 ve 4.23'te verilmiştir. Laktobasil suşları arasında 1030, 480, 1270 ve 24 no'lu izolatlar tüm LAB izolatlarına göre oldukça yüksek β-galaktosidaz aktivitesi göstermiş olup elde edilen değerler sırasıyla 181.87, 177.93, 132.57 ve 120.17 MU olarak belirtilmiştir. Streptokoklarda izolat 930 ve izolat 120 sırasıyla 43.33 ve 35.17 MU değerleriyle diğer streptokok izolatlarına göre nispeten daha yüksek β-galaktosidaz aktivite gösterirken enterokoklarda en yüksek değer olarak 15.77 MU (izolat 1050) belirlenmiştir.



Şekil 4.4: 1030, 1270, 24 ve 480 no'lu izolatların β-galaktosidaz aktivitesi analizinde sarı renk oluşumu

Glikosidazlar, glikozidik bağları hidrolize edebilen enzimlerdir. Tüm organizmalarda yaygın olarak bulunurlar. Bir glikozidaz olan β-galaktosidaz, süt ürünleri teknolojilerinde yaygın olarak kullanılan bir enzimdir. Bu enzim, sütteki ana karbonhidrat olan laktozu hidrolize ederek laktozun kristalleşmesini önlemek, tatlılığı geliştirmek, süt ürünlerinin çözünürlüğünü artırmak ve laktozsuz gıda ürünleri üretmek için glikoz ve galaktoza dönüştürür. İnsanlarda β-galaktosidaz enziminin bozulması, laktoz intoleransı olarak bilinen sindirim yetmezliğine neden olur. Süt ürünlerinde yüksek miktarda β-galaktosidaz enzimi üreten bakteri varlığı veya eklenmesi bu yetersizliği telafi edebilir. β-galaktosidazların diğer bir faydalı etkisi, laktoz hidrolizi

sırasında meydana gelen ve prebiyotik özelliklere sahip galakto-oligosaritlerin oluşumuna yol açan reaksiyonların meydana gelmesidir (Okuklu, 2014).

Boricha ve ark. (2019) incelediği 8 *Lactobacillus* izolatından 6'sının bu aktiviteyi gösterdiğini ve bu 6 laktobasil izolatının β-galaktosidaz aktivite değerlerinin 175-419 MU arasında değiştiğini belirtmiştir. Başka bir çalışmada 9 *Lactobacillus plantarum* suşu incelenmiş ve bu suşların aktivite değerleri 0.6- 265.3 MU aralığında tespit edilmiştir (Shekh ve ark., 2016). Nami ve ark. (2019) *Enterococcus* suşlarının β-galaktosidaz aktivitesini kalitatif olarak incelemiş ve 7 enterokok izolatından 4'ünde bu enzimin varlığını tespit etmiştir.

Probiyotik mikroorganizmalar laktozu parçalayarak konakçı sağlığı için faydalı olan kısa zincirli yağ asitlerine dönüştürür. Bu nedenle, β-galaktosidaz aktivitesi gösteren kültürler ile fermente edilen ürünler, laktoz intoleransının tedavisinde hayati bir rol oynamaktadır. Bu çalışmada da 1030, 480, 1270 ve 24 no'lu *Lactobacillus* izolatlarının diğerlerine göre daha yüksek aktivite gösterdiği ve fermente süt ürünlerinde starter kültür olarak kullanıldığında laktoz intoleransı olan kişiler için fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

4.3.9. Kolesterol asimilasyonu sonuçları ve tartışma

Bu çalışmada LAB'lerinin kolesterol düşürücü etkisi 100 µg/ml suda çözünebilir kolesterol içeren ortamda incelenmiş ve sonuçlar Tablo 4.21, 4.22 ve 4.23'te verilmiştir. *Lactobacillus* suşlarının kolesterol asimilasyon değerleri % 16.01-53.67 arasında bulunurken 11 laktobasil suşunun 7 tanesi (184, 1030, 15, 16, 288, 665 ve 675) % 40'ın üzerinde asimilasyon göstermiştir.

Enterococcus suşları arasında 99 (% 50.85) ve 12 (% 48.49) no'lu izolatlar en yüksek değerlere sahip olup diğer enterokok izolatlarının % asimilasyon değerleri 4.71-22.13 arasında değişmektedir.

Streptokok suşları ile yapılan test sonuçlarına göre bu izolatların laktobasil ve enterokoklara göre daha düşük bir kolesterol düşürme etkisi sergilediği belirlenmiş olup en yüksek değere % 29.66 ile 1214 no'lu izolatta rastlanmıştır.

Lim ve ark. (2004)'nın kolesterol seviyesini düşüren laktik asit bakterilerinin probiyotik olarak kullanımı üzerine yaptıkları çalışmada % 0.3 sığır safrası içeren ortamda streptokok suşlarının kolesterol düşürme oranının % 0-49.4, laktobasil suşlarının kolesterol düşürme oranının ise % 31.5-58.5 arasında değiştiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada *Streptococcus* HJS-1 (% 49.4) ve *Lactobacillus* HJL-37 (% 58.1) izolatlarının iyi bir hipokolesterolemik etkiye sahip olduğu ve probiyotik aday olabileceği öne sürülmüştür. Ancak başka bir çalışmada ticari probiyotik olan *Lb. casei* Shirota'nın farklı safra tuzu kullanılan 3 ortamda kolesterol asimilasyon yüzdesi hesaplanmış ve bu değerin sodyum taurokolat içeren ortamda % 5-10, oxbile içeren ortamda % 10-15, kolik asit içeren ortamda % 20-25 arasında olduğu belirtilmiş olup (Angmo ve ark., 2016) oxbile içren ortamda elde edilen değerler ile karşılaştırıldığında bizim çalışmamızda incelenen izolatların (1041, 1078, 1046, 932, 937 ve 1191 hariç) daha yüksek asimilasyon yüzdesine sahip olduğu görülmektedir.

Tablo 4.21: *Lactobacillus* suşlarının kolesterol asimilasyon yeteneği, β-galaktosidaz aktivitesi ve EPS üretim sonuçları

İzolat No	Kolesterol Asimilasyonu (%)	β-gaktosidaz Aktivitesi (MU)	EPS üretimi (µg/mL)
665	41.43±3.99^{b}	4.80±0.09^{c}	355.81±113.11^{abc}
1030	49.44±2.00^{ab}	181.87±22.91^{a}	308.88±63.72^{abc}
1270	26.37±3.99^{c}	132.57±3.63^{b}	198.48±26.55^{c}
16	41.90±0.67^{b}	9.80±0.66^{c}	424.90±74.87^{ab}
184	53.67±1.33^{a}	8.10±0.05^{c}	391.86±72.75^{abc}
15	43.79±2.00^{b}	10.37±0.42^{c}	361.44±41.42^{abc}
449	22.13±0.67^{cd}	6.83±0.05^{c}	276.58±16.99^{bc}
24	16.01±2.66^{d}	120.17±8.44^{b}	281.09±22.30^{bc}
480	18.36±0.67^{cd}	177.93±11.13^{a}	341.54±29.21^{abc}
675	40.49±2.66^{b}	9.93±0.38^{c}	373.84±32.39^{abc}
288	41.90±0.67^{b}	14.67±0.85^{c}	517.65±52.04^{a}

Verilen değerler 2 tekerrürün aritmetik ortalamasıdır ve aritmetik ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir.
Önemli farklılıklar Tukey testi ile $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir.
Aynı sütundaki istatistiki farklılıklar küçük harf ile ifade edilmiştir.

Nakajima ve ark. (1992) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, EPS üreten ve üretmeyen iki *Lb. lactis subsp. cremoris* suşunun kolesterolü bağlama özellikleri incelenmiş ve sonuçta ekzopolisakkarit üreten suşun, üretmeyen diğer suşa kıyasla daha fazla kolesterolü bağlayabildiği gösterilmiştir. Araştırıcılar, hücreler tarafından üretilen EPS miktarının yüksek olması durumunda, bu polisakkaritlerin diyetle alınan lifli gıdalara benzer bir etki gösterebileceğini ve bu suretle kolesterolün, bakteriler tarafından üretilen EPS'ye bağlanarak atılan kolesterol miktarının artabileceğini ve

böylece bağırsaklardan emilerek kana karışan kolesterol miktarında azalma meydana gelebileceğini öne sürmüşlerdir. Yaptığımız çalışmada da kolesterol asimilasyonu yüksek olan izolatların EPS üretim miktarları diğer izolatlara nispeten daha yüksek bulunmuştur.

Kolesterol ve diğer kan lipidleri, dünya çapında önemli bir ölüm nedeni olan koroner kalp hastalığı da dahil olmak üzere kardiyovasküler hastalıkların başlıca nedenidir. Serum kolesterolünü düşürmek için çok sayıda ilaç bulunmasına rağmen bunların birçok yan etkisi vardır. Son yıllarda fermente süt ürünlerinin kolesterol düşürücü etkisine ilişkin araştırmalar artmıştır. Bu araştırmaların çoğunda LAB'ların kolesterol azaltıcı etkileri rapor edilmiştir (Vidhyasagar ve Jeevaratnam, 2013). Yapılan bu çalışmada da 184, 1030, 15, 16, 288, 665 ve 675 no'lu laktobasil ile 99 ve 12 no'lu enterokok izolatlarının serum kolesterol seviyesinin düşürülmesinde iyi bir etkiye sahip olduğu görülmektedir.

Tablo 4.22. *Enterococcus* suşlarının kolesterol asimilasyon yeteneği, β-galaktosidaz aktivitesi ve EPS üretim sonuçları.

İzolat No	Kolesterol Asimilasyonu (%)	β-gaktosidaz Aktivitesi (MU)	EPS üretimi (µg/mL)
99	50.85 ± 2.66^{a}	7.20 ± 0.09^{f}	531.17 ± 47.79^{a}
12	48.49 ± 0.67^{a}	9.63 ± 0.24^{c}	254.43 ± 13.28^{b}
277	12.24 ± 6.66^{bcd}	7.80 ± 0.19^{e}	303.24 ± 92.93^{ab}
894	22.13 ± 0.67^{b}	8.80 ± 0.09^{d}	323.15 ± 103.02^{ab}
702	20.72 ± 1.33^{b}	6.47 ± 0.09^{g}	267.20 ± 48.32^{b}
382	20.72 ± 2.66^{b}	12.60 ± 0.09^{b}	255.56 ± 3.19^{b}
1041	4.71 ± 1.33^{d}	7.50 ± 0.14^{ef}	217.26 ± 30.8^{b}
394	11.77 ± 2.00^{bcd}	7.67 ± 0.09^{ef}	344.92 ± 84.96^{ab}
1078	6.59 ± 2.66^{cd}	6.40 ± 0.09^{g}	252.93 ± 63.19^{b}
1050	15.54 ± 0.67^{bc}	15.77 ± 0.14^{a}	287.47 ± 47.26^{ab}

Verilen değerler 2 tekerrürün aritmetik ortalamasıdır ve aritmetik ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir.
Önemli farklılıklar Tukey testi ile $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir.
Aynı sütundaki istatistiki farklılıklar küçük harf ile ifade edilmiştir.

4.3.10. Ekzopolisakkarit üretimi sonuçları ve tartışma

Mikroorganizmalar tarafından üretilen EPS, bağırsak epitel dokusu ile bağırsak mikroflorasında bulunan bakteriler arasında bir bağ oluşturduğundan dolayı EPS üretebilen suşlar epitel hücreye yüksek kapasitede tutunma özelliğine sahiptirler (Böke, 2005; Şahin, 2012)(Böke, 2005; Şahin, 2012)(Böke, 2005; Şahin, 2012)(Böke, 2005; Şahin, 2012)(Böke, 2005; Şahin, 2012)(Böke, 2005; Şahin,

2012)(Böke, 2005; Şahin, 2012). Bu özellik sayesinde bulundukları ortamda probiyotikler canlılığını devam ettirebilmektedir (Böke, 2005; Şahin, 2012). Bu çalışmada test edilen LAB suşlarından EPS izolasyonu yapılmış olup fenol-sülfirik asit yöntemi ile üretilen EPS miktarları belirlenmiştir. *Lactobacillus, Enteococcus* ve *Streptococcus* izolatlarına ait EPS üretim miktarları sırasıyla Tablo 4.21, 4.22 ve 4.23'te verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre analize tabi tutulan tüm izolatlarda EPS üretimi gözlemlenmiş olup miktarlar laktobasillerde 198.48-517.65 µg/mL, enterokoklarda 217.26-531.17 µg/mL ve streptokoklarda 250.30-365.95 µg/mL arasında değişmektedir.

288 (517.65 µg/mL),16 (424.90 µg/mL) ve 184 (391.86 µg/mL) no'lu laktobasil; 99 (531.17 µg/mL), 394 (344.92 µg/mL) ve 894 (323.15 µg/mL) no'lu enterokok ve 1046 (365.95 µg/mL), 375 (327.28 µg/mL) ve 930 (314.13 µg/mL) no'lu streptokok izolatları kendi türleri içerisinde en yüksek miktarda EPS üreten izolatlar olarak tespit edilmiştir. Tüm tablolar incelendiğinde izolat 1270 (198.48 µg/mL), 1041 (217.26 µg/mL) ve 1214 (250.30 µg/mL) çalışmada kullanılan diğer izolatlara göre daha düşük miktarlarda EPS üretimi gerçekleştirmiştir.

Tablo 4.23: *Streptococcus* suşlarının kolesterol asimilasyon yeteneği, β-galaktosidaz aktivitesi ve EPS üretim sonuçları.

İzolat No	Kolesterol Asimilasyonu (%)	β-gaktosidaz Aktivitesi (MU)	EPS üretimi (µg/mL)
1046	7.53 ± 1.33^{cd}	6.33 ± 0.47^{d}	365.95 ± 57.35^{a}
932	5.65 ± 1.33^{d}	6.43 ± 0.42^{d}	299.11 ± 20.18^{a}
120	19.30 ± 0.67^{b}	35.17 ± 0.99^{b}	293.48 ± 9.03^{a}
930	13.65 ± 3.33^{bc}	43.33 ± 2.55^{a}	314.13 ± 7.43^{a}
937	5.18 ± 0.67^{d}	7.03 ± 0.14^{d}	308.50 ± 4.78^{a}
1191	2.82 ± 1.33^{d}	7.17 ± 0.05^{d}	291.98 ± 28.14^{a}
375	15.54 ± 2.00^{b}	7.10 ± 0.05^{d}	327.28 ± 14.34^{a}
1214	29.66 ± 0.67^{a}	15.93 ± 0.09^{c}	250.30 ± 52.04^{a}

Verilen değerler 2 tekerrürün aritmetik ortalamasıdır ve aritmetik ortalama ± standart sapmayı ifade etmektedir.
Önemli farklılıklar Tukey testi ile $p < 0.05$ düzeyinde belirlenmiştir.
Aynı sütundaki istatistiki farklılıklar küçük harf ile ifade edilmiştir.

EPS, hem ilaç hem de gıda endüstrilerinde uygulamaya sahip olan çok işlevli bir bileşiktir. Ayrıca, insan mukozasına *in vivo* adhezyon yeteneği, antibiyofilm özelliği ve bağışıklık düzenleme özelliğine sahip olduğundan insan sağlığı için önemlidir (Liu ve ark., 2011; Russo ve ark., 2012; Rendueles ve ark., 2013; Rajoka ve ark., 2018). LAB tarafından üretilen EPS miktarı, pH, sıcaklık ve ortam bileşimi gibi kültür ve

fermentasyon koşullarından güçlü bir şekilde etkilenir (Dueñas-Chasco ve ark., 1998; de Almeida Júnior ve ark., 2015). Laktik asit bakterilerinin incelendiği bir çalışmada Georgalaki ve ark. (2000) *S. macedonicus* suşlarının biyokimyasal özelliklerini incelemiş ve bu suşların hiçbirinin EPS üretmediğini belirtmiştir. Bununla birlikte laktik asit bakterilerinin probiyotik özelliklerinin incelendiği diğer çalışmalarda EPS üreten izolatlar tespit edilmiş ancak miktar tayini yapılmamıştır (Angmo ve ark., 2016; Abushelaibi ve ark., 2017; Fguiri ve ark., 2017; Rajoka ve ark., 2017; Ayyash ve ark., 2018; Rajoka ve ark., 2018). Öte yandan de Almeida Júnior ve ark. (2015)'nın yaptığı çalışmada keçi sütünden izole edilen 50 laktik asit bakterisinin EPS üretim miktarları 10-100 mg/L arasında belirlenmiş olup ortalama üretim miktarının 26.60 mg/L olduğu ve 50 izolattan 21'inin ortalamanın üzerinde EPS ürettiği tespit edilmiştir. EPS üretme yeteneğine sahip LAB'lar probiyotik etkilerinin yanında ayrıca süt ürünlerinin tekstür ve viskozitesini de geliştirir. Böylece EPS üreten LAB'lar süt endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında izole edilen tüm izolatlarda EPS üretiminin olduğu belirlenmiş olup bu suşların hem probiyotik olarak kullanıldığında bağırsağa tutunmasında avantaj sağlayacağı, hem de starter kültür olarak kullanımda süt ürünlerinin tekstür ve viskozitesine olumlu etkiler göstereceği ön görülmektedir.

4.3.11. Antibiyotik direnci sonuçları ve tartışma

Probiyotiklerin antibiyotik direnci, gen transfer riski mevcut olduğunda bir güvenlik sorunu olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, probiyotik bakterilerin antibiyotik direncinin olmaması, FAO/WHO (2002) tarafından belirtilen probiyotik seçim kılavuzları için önemli bir güvenlik parametresi olarak kabul edilmektedir. Çalışmada probiyotik özellikleri değerlendirilen LAB izolatlarının amfisilin (10 µg), kloramfenikol (30 µg), eritromisin (15 µg), gentamisin (10 µg), kanamisin (30 µg), penisilin (10 U), streptomisin (10 µg), tetrasiklin (30 µg) ve vankomisin (30 µg) antibiyotiklerine karşı dirençleri disk difüzyon yöntemi ile tespit edilmiş olup izolatlara ait sonuçlar Tablo 4.24'te verilmiştir.

Yapılan analiz sonuçlarına göre tüm LAB izolatları gentamisin, kanamisin ve streptomisine karşı direnç gösterirken kloramfenikol antibiyotiğine karşı duyarlı oldukları belirlenmiştir. Aynı zamanda 480 ve 288 no'lu laktobasil izolatları dışındaki tüm izolatların ampisiline karşı hassas/yarı-hassas ve laktobasiller ve 1050 no'lu

enterokok izolatı dışındaki tüm izolatların vankomisine karşı hassas oldukları görülmekte olup penisiline karşı sadece 24, 937 ve 1214 no'lu izolatların direnç gösterdiği belirlenmiştir. Eritromisine karşı *Lactobacillus* spp.'de direnç gösteren izolat tespit edilmemesine rağmen *Enterococcus* spp. (277, 894, 382 ve 1050) ve *Streptococcus* spp.'de (1046, 932, 937, 1191 ve 375) toplamda 9 izolat direnç göstermiştir. İki laktobasil (24 ve 480), bir enterokok (1050) izolatı dışında geriye kalanlar tetrasikline karşı direnç göstermezken, streptokok izolatları arasında sadece 3 izolatın (120, 930 ve 375) hassasiyet gösterdiği tespit edilmiştir.

Tablo 4.24: *Lactobacillus, Enterococcus ve Streptococcus* suşlarının **a**ntibiyotik dirençlerine ait sonuçlar

	İzolat No	AM	C	E	CN	K	P	S	TE	VA
***Lactobacillus* spp.**	**665**	H	H	H	D	D	H	D	YH	D
	1030	YH	H	H	D	D	H	D	H	D
	1270	YH	H	YH	D	D	YH	D	H	D
	16	YH	H	H	D	D	H	D	H	D
	184	H	H	YH	D	D	H	D	H	D
	15	YH	H	YH	D	D	H	D	H	D
	449	YH	H	YH	D	D	YH	D	H	D
	24	YH	H	YH	D	D	D	D	D	D
	480	D	H	YH	D	D	YH	D	D	D
	675	YH	YH	YH	D	D	H	D	YH	D
	288	D	H	H	D	D	YH	D	H	D
***Enterococcus* spp.**	**99**	H	H	YH	D	D	H	D	YH	H
	12	H	H	YH	D	D	H	D	H	H
	277	H	H	D	D	D	H	D	H	H
	894	H	H	D	D	D	H	D	YH	H
	702	H	H	YH	D	D	H	D	H	H
	382	H	H	D	D	D	H	D	H	H
	1041	H	H	YH	D	D	H	D	H	H
	394	H	H	YH	D	D	H	D	H	H
	1078	H	H	YH	D	D	H	D	H	H
	1050	H	H	D	D	D	H	D	D	D
***Streptococcus* spp.**	**1046**	H	H	D	D	D	H	D	D	H
	932	H	H	D	D	D	H	D	D	H
	120	H	H	YH	D	D	H	D	YH	YH
	930	H	H	YH	D	D	H	D	H	H
	937	H	H	D	D	D	D	D	D	H
	1191	H	H	D	D	D	H	D	D	H
	375	H	H	D	D	D	H	D	YH	H
	1214	H	H	YH	D	D	D	D	D	H

AM: amfisilin (10 µg); C: kloramfenikol (30 µg); E: eritromisin (15 µg); CN: gentamisin (10 µg); K: kanamisin (30 µg); P: penisilin (10 U); S: streptomisin (10 µg); TE: tetrasiklin (30 µg); VA: vankomisin (30 µg).
D:dirençli. YH: yarı hassas. H: hassas

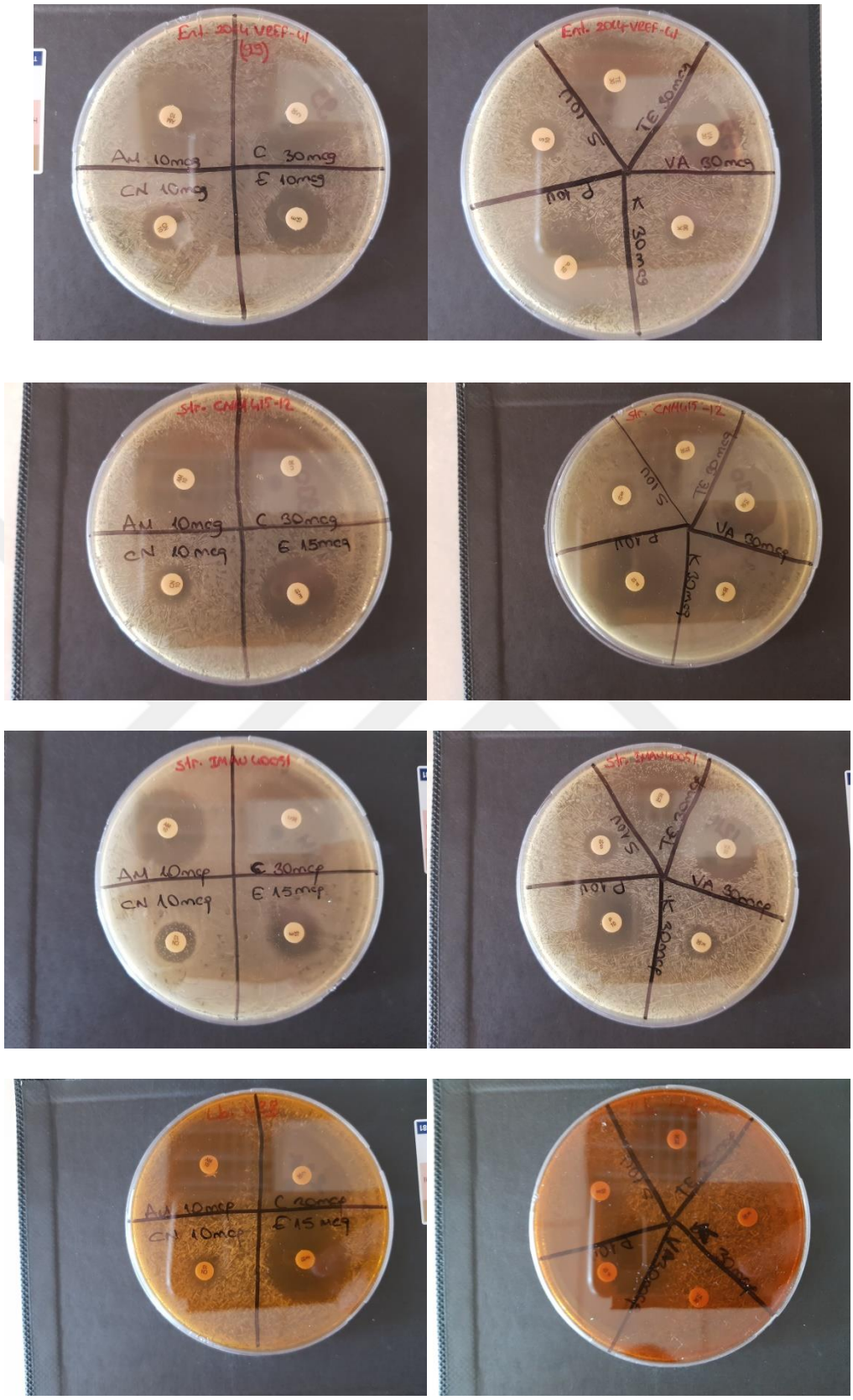
Probiyotik gibi faydalı mikroorganizmaların antibiyotik direncinin, özellikle direnç geni plazmid tarafından kodlandığında, gıdalardan bağırsak bakteri popülasyonuna trasfer edilme riski ortaya çıkabilmektedir (Devirgiliis ve ark., 2011; Gueimonde ve ark., 2013). Bu nedenle probiyotik mikroorganizmaların özellikle

patojen bakterilere transfer edilebilen antibiyotik direnç genlerini taşımaması gerekmektedir. Bununla birlikte LAB'ların bazı antibiyotiklere karşı doğal direnç gösterdiği ve antibiyotik tedavisi sırasında bağırsak mikrobiyotasını canlı tutmak için konakçı hücreye fayda sağladığı bilinmektedir (Hashemi ve ark., 2014). Örneğin; gentamisin, kanamisin ve streptomisin gibi aminoglikozid antibiyotiklere karşı birçok *Lactobacillus* spp *ve S. thermophilus*'un doğal direnç gösterdiği rapor edilmiştir (Ammor ve ark., 2007; Ouwehand ve ark., 2016).

Ayrıca *Lactobacillus* cinsinin vankomisine karşı doğal dirence sahip olduğu da bilinmektedir (Danielsen ve Wind, 2003). Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara göre tüm izolatların gentamisin, kanamisin ve streptomisine karşı direnç gösterdiği tespit edilmiş olup bu direnç genlerinin aktarılabilir olmadığı düşünülmektedir. Bu nedenle fenotipik test sonuçlarının genomik veriler ile desteklenmesi önerilmektedir.

Probiyotik potansiyele sahip *Lactobacillus* suşlarının antibiyotik dirençlerinin incelendiği bir çalışmada Han ve ark. (2015) çalışmamızda elde ettiğimiz verilere benzer sonuçlar tespit etmiştir. Ayrıca başka bir çalışmada Santos ve ark. (2015) *Ent. faecium* suşlarının amfisilin, eritromisin, gentamisin ve penisiline karşı hasssiyet gösterdiğini ancak tetrasiklin ve vankomisine karşı dirençli olduğunu tespit etmiştir. Bazı antibiyotiklere karşı doğal direncin, gıdalardan izole edilen *Enterococcus* suşları arasında bulunan bir özellik olduğunu belirtmişlerdir. Öte yandan Pieniz ve ark. (2015) potansiyel probiyotik etkiye sahip 2 adet *Ent. durans* izolatının eritromisin, tetrasiklin, vankomisin, gentamisin ve penisiline karşı direnç göstermediğini bildirmişlerdir.

Tarrah ve ark. (2018) probiyotik potansiyelini incelediği *S. thermophilus* suşlarının hepsinin mevcut çalışmada olduğu gibi streptomisin ve kanamisine karşı dirençli olduğunu belirtmiş ve ticari probiyotik olan *Lb. rhamnosus* GG suşunun 14 antibiyotikten 6'sına dirençli olduğunu böylelikle incelediği *S. thermophilus* suşlarının da dirençlerinin doğal direnç olabileceğini öne sürmüştür. Yapmış olduğumuz bu çalışmada incelediğimiz LAB izolatlarının herbiri en az 3 antibiyotiğe karşı direnç göstermekle birlikte bunların aktarılabilir gen olup olmadığını anlamak için ilave genomik çalışmaların yapılması gerekmektedir.



Şekil 4.5: Laktik asit bakterilerinin antibiyotiklere karşı oluşturdukları zon görüntüsü

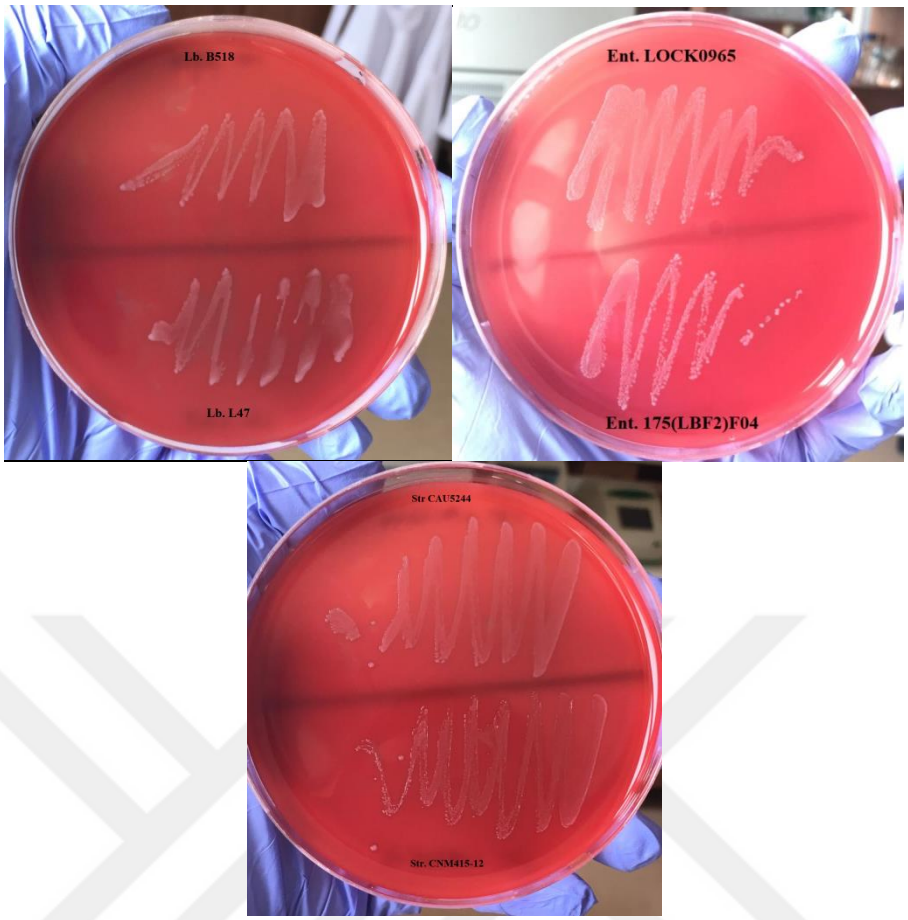
4.3.12. Hemolitik aktivite sonuçları ve tartışma

Çalışma kapsamında LAB suşlarının hemolitik aktiviteleri % 5 defibrin koyun kanı içeren Blood agar plakalarında test edilmiş olup, kontrol suşları olarak kullanılan *E. coli* ATCC 25922'nin bulunduğu ortamda kolonilerin etrafında yeşil zon (α-hemolitik) oluşurken, *Staph. aureus* ATCC 25923'ün geliştiği ortamda, kolonilerin etrafında berrak zon (β-hemolitik) meydana gelmiştir (Şekil 4.6). Çalışmada incelenen LAB izolatlarının kolonilerinin etrafında ise zon oluşumu gözlemlenmemiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.6: *E. coli* ATCC 25922 (α-hemoliz) ve *Staph. aureus* ATCC 25923 (β-hemoliz) patojenlerinin hemolitik aktivite görüntüleri

Hemolitik aktivitenin belirlenmesi, probiyotik mikroorganizmaların güvenli kullanımı için önemli bir analiz olup probiyotik seçiminde kritik bir aşamadır. Probiyotik olarak kullanım potansiyeli olan mikroorganizmaların, hemolize neden olmayan γ-hemolitik aktivite göstermesi gerekmektedir (Uymaz, 2009). LAB'ların probiyotik özellikleri üzerine yapılan çalışmalarda Pieniz ve ark. (2015), Ben Braïek ve ark. (2018) ve Zoumpopoulou ve ark. (2018) bizim sonuçlarımız ile uyumlu veriler elde etmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre çalışmamızda kullanılan tüm izolatların hemolitik aktivitelerinin probiyotik olarak kullanım açısından bir sorun teşkil etmeyeceği görülmektedir.



Şekil 4.7: *Lactobacillus, Enterococcus* ve *Streptococcus* izolatlarına ait hemolitik aktivite görüntüleri (γ-hemoliz)

4.3.13. Biyojen amin üretimi sonuçları ve tartışma

Çalışmada incelenen LAB'ların biyojen amin üretim yetenekleri % 1 oranında arjinin, lisin, tirosin ve ornitin amino asitlerini içeren ortamda test edilmiş ve besiyeri renginin sarıdan mora dönüşmesi biyojen amin üretiminin göstergesi şeklinde yorumlanmış olup elde edilen sonuçlar Tablo 4.25'te verilmiştir.

Lisin, tirosin ve ornitin içeren ortamlarda biyojen amin oluşumu tespit edilmemiştir. Ancak 4 laktobasil (665, 1030, 1270 ve 15), 4 enterokok (277, 1041, 394 ve 1050) ve 2 streptokok (120 ve 937) izolatının arjinin dekarboksilasyonu meydana getirdiği belirlenmiştir.

Amino asitlerin bakteriyel dekarboksilasyonu ile üretilen biyojenik aminler birçok gıdada, özellikle peynir, şarap ve bira gibi fermente edilmiş gıda ürünlerinde bulunabilir (Halász ve ark., 1994). Düşük biyojenik amin seviyeleri insanlar tarafından

tolere edilebilmesine rağmen, bu moleküllerin yüksek miktarlarda, alınması gıda zehirlenmesine neden olabilir (Santos, 1996). *Lactobacillus* spp. üzerine yapılan çalışmalarda izolatların ornitin, lisin, histidin ve tirosin amino asitleri içeren ortamda biyojen amin üretim yetenekleri değerlendirilmiş ve izolatların hiçbirinin BA oluşturmadıkları tespit edilmiştir. (Shekh ve ark., 2016; Boricha ve ark., 2019). Başka bir çalışmada Tarrah ve ark. (2018) 8 adet *Streptococcus thermophilus* suşunun histamin ve tiramin üretimlerini incelemiş ve 6 suşun iki biyojen aminide üretmediğini, 1 suşun ise her ikisinide ürettiğini belirtmiş olup iki BA'yı da üreten izolatın yüksek probiyotik özelliklerinden dolayı insan sağlığına potansiyel faydalı etkilerini değerlendirmek için *in vivo* çalışmalar yapılabileceğini önermiştir.

Tablo 4.25: *Lactobacillus, Enterococcus ve Streptococcus* suşlarının biyojen amin üretimi

	İzolat No	L-arjinin	L-lisin	L-tirosin	L-ornitin
***Lactobacillus* spp.**	**665**	+	-	-	-
	1030	+	-	-	-
	1270	+	-	-	-
	16	-	-	-	-
	184	-	-	-	-
	15	+	-	-	-
	449	-	-	-	-
	24	-	-	-	-
	480	-	-	-	-
	675	-	-	-	-
	288	-	-	-	-
***Enterococcus* spp.**	**99**	-	-	-	-
	12	-	-	-	-
	277	+	-	-	-
	894	-	-	-	-
	702	-	-	-	-
	382	-	-	-	-
	1041	+	-	-	-
	394	+	-	-	-
	1078	-	-	-	-
	1050	+	-	-	-
***Streptococcus* spp.**	**1046**	-	-	-	-
	932	-	-	-	-
	120	+	-	-	-
	930	-	-	-	-
	937	+	-	-	-
	1191	-	-	-	-
	375	-	-	-	-
	1214	-	-	-	-

(-):üretim yok, (+): üretim var.

Tokatlı (2013) lisin, histidin ve arjinin ilave edilerek gerçekleştirilen biyojen amin denemelerinde, bizim çalışmamızda olduğu gibi sadece arjinin içeren besiyerinde bazı kültürlerin biyojen amin oluşturduklarını belirtmiştir. Gıda sınıfı veya probiyotik

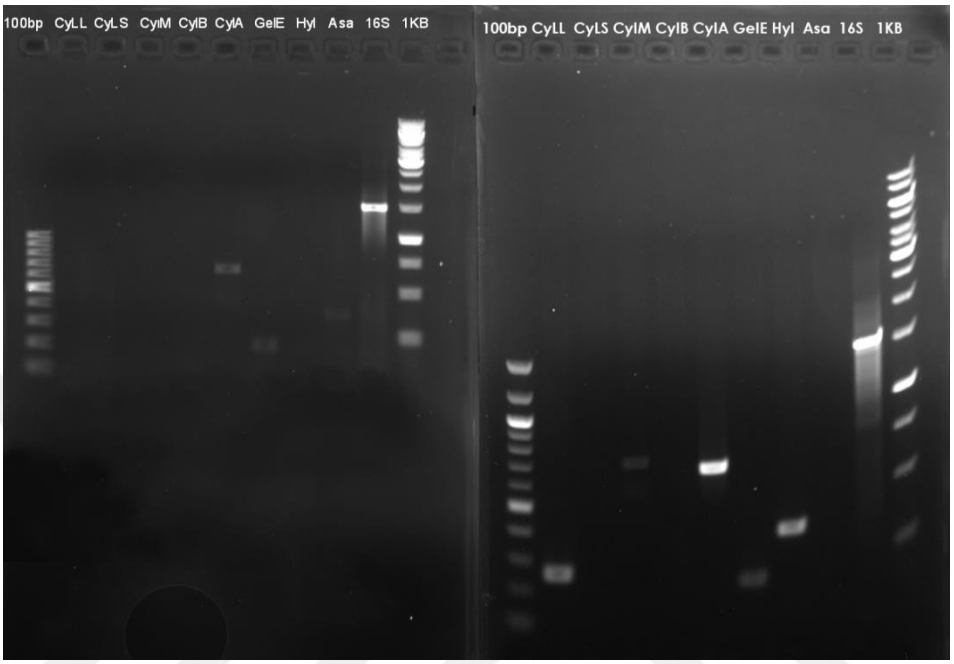
suşlar tarafından biyojen amin üretimi düşük olmalı veya hiç olmamalıdır. Bizim çalışmamızda da 19 izolat biyojen amin oluşturmazken 10 LAB suşunda sadece arjinin dekarboksilasyonu belirlenmiştir. BA oluşturan bu suşların üretim miktarlarının tespit edilip toksik etki oluşturabilecek düzeyde olup olmayacağı araştırılmalıdır

4.3.14. Virülans gen tespiti sonuçları ve tartışma

Son zamanlarda, *Enterococcus* spp. starter veya yardımcı kültür olarak kullanıldıklarında, peynir gibi fermente süt ürünlerinin arzu edilen organoleptik özelliklerinin geliştirilmesinde, probiyotik özelliklerinin ve önemli rollerinin yanında fırsatçı patojenler olarak ortaya çıkmaktadır (Graham ve ark., 2020). Bu nedenle çalışmamızda, gastrointestinal direnç, adhezyon yeteneği ve bazı fonksiyonel özellikler üzerine yapılan analizler sonucunda, en potansiyel probiyotik suş olan 99, 394 ve 894 no'lu enterokok izolatları virülans özellikleri açısından incelenmiştir. Bu amaçla jelatinaz (*gelE*), agregasyon maddesi (*asa1*), hiyalüronidaz (hyl_{efm}) ve sitolizin (*CylA*) aktivatörü, sitolizin taşınması (*CylB*), sitolizin öncülleri ($CylL_l$ ve $CylL_s$), sitolizin modifikasyonu (*CylM*) genlerinin varlığına bakılmıştır. İzolat 99'da herhangi bir virülans gene rastlanmamış olmakla birlikte incelenen diğer suşlardan her ikisi de *gelE* ve *cylA* genleri barındırmaktadır. Ayrıca izolat 394 $cylL_l$, *cylM* ve hyl_{efm} virülans genlerine sahipken izolat 894, PCR amplifikasyonunda gösterildiği gibi *asal* geni için pozitif olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.8).

Jelatinaz, yapışma özellikleri ve serin proteaz ile ilgili olan *gelE* geni tarafından kodlanır ve kazein degradasyonundan ve bunu takiben biyoaktif peptidlerin üretiminden sorumludur (Gutiez ve ark., 2014; Popović ve ark., 2018). Yapılan bir çalışmada, *gelE* genlerinin esas olarak *Ent. faecalis* izolatları ile ilişkili olduğu, ancak *Ent. faecium* suşlarında nadirende olsa tespit edildiği belirtilmiştir (Graham ve ark., 2020). Yapılan çalışma sonuçlarına göre, geleneksel Tunus etinden izole edilen beş adet *Ent. faecium* izolatından ikisi ve Mısır'da çiğ sütten üretilen peynirlerden izole edilen altı adet *Ent. faecium* izolatından ikisi $gelE^+$ olarak tespit edilmiştir (Hammad ve ark., 2015; Zommiti ve ark., 2018). Nitekim Popović ve ark. (2018), süt izolatlarında yüksek miktarda *gelE* genlerinin bulunduğunu belirtmiştir. Ayrıca, bazı araştırmacıların enterokok suşlarının herhangi birinde *gelE* genlerinin varlığının tespit edilmesine rağmen, jelatin içeren ortamda jelatinaz aktivitesinin tespit edilmediğini, dolayısıyla bu genin inaktif olduğunu

veya düşük derecelerde eksprese edildiğini gözlemlemesi oldukça önemlidir (Popović ve ark., 2018; Baccouri ve ark., 2019). Öte yandan Graham ve ark. (2020), bu enzimin proteolitik aktivite yoluyla peynirin olgunlaşması gibi bazı gıda teknolojisi alanlarında faydalı etkileri olabileceğini ileri sürmektedir.



(A) **(B)**

Şekil 4.8*:* *Ent. faecium* izolat 894 (A) ve 394 (B)'ün virülans faktörlerinin PCR amplifikasyon görüntüsü

Sitolizin, *cylR*$_{1,2}$, *cylL*$_l$, *cylL*$_s$ *cylM, cylB* ve *cylA* gibi bazı genlerin aracılık ettiği ekzotoksin tipi bir bakteriyosindir (Chajęcka-Wierzchowska ve ark., 2017). Aynı zamanda hemolizin olarak da adlandırılmakta ve insanlarda β-hemolitik aktiviteler gösterebilmektedir (Popović ve ark., 2018). Çalışmamızda, test edilen 394 ve 894 no'lu *Ent. faecium* izolatlarının her ikisi de *cylA* için pozitif iken izolat 394 ayrıca *cylL*$_l$ ve *cylM* için pozitiftir. Ancak bu suşlardan hiçbiri *in vitro* hemoliz testlerinde β-hemolitik aktivite göstermemiştir. Bu sonuca göre ilgili bu genlerin inaktif olabileceği çıkarımı yapılabilmektedir (Şekil 4.8). Hammad ve ark. (2015) Mısır'da çiğ sütten üretilen peynirlerden izole edilen 120 enterokok izolatının sadece % 0.83'ünün *cylA*$^+$ olduğunu, ancak bunların arasında *Ent. faecium* suşlarının bulunmadığını belirtmiştir. Klinik enterokok suşlarında bu genin yaygınlığı ile ilgili olarak, Kiruthiga ve ark. (2020) tarfından yapılan çalışmada, *Ent. faecalis* suşlarında (% 59.55) *Ent. faecium* suşlarına (% 1.96) oranla *cylA* geninin daha yaygın bulunduğu belirtilmiştir.

asa1 (agregasyon maddesi) geni, konakçı dokuya adhezyon kabiliyetini arttıran enterokokal bir yüzey proteinidir. *asa1,* potansiyel virülans faktörleri ve antibiyotik direnç genlerini içeren plazmidlerin hücre kümelenmesi yoluyla diğer mikroorganizmalara transferi açısından önemli olarak kabul edilmektedir (Graham ve ark., 2020). Ancak adhezyon kabiliyetini indükleyen bu agregasyon maddelerinin, probiyotik potansiyeli artıran bazı özellikleri diğer suşlara aktarma ihtimali de bulunmaktadır (Veljović ve ark., 2017). Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre izolat 394'te *asa1* geni bulunmazken izolat 894 bu gen için pozitif bulunmuştur. Daha önce Popović ve ark. (2018), süt ürünlerinde izole edilen enterokok izolatlarının % 69.2'sinin *asa1* için pozitif olduğunu bildirirken, Baccouri ve ark. (2019), test edilen *Ent. faecalis* izolatlarının ve probiyotik *Ent. faecalis* Symbioflor1'in *asa1*$^{+}$ olarak bulunduğunu belirtmiştir. Öte yandan Zommiti ve ark. (2018), beş *Ent. faecium* izolatından sadece birinin agg^{+} olduğunu, Belgacem ve ark. (2010) ise test edilen 24 *Ent. faecium* izolatının hiçbirinde agregasyon maddesi genlerinin bulunmadığını belirtmiştir.

Bağ dokularının degredasyonunda rol oynayan bir protein olan *hyl* (hiyalüronidaz), diğer enterokoklardan ziyade klinik *Ent. faecium* genomu ile tanımlanmaktadır (Chajęcka-Wierzchowska ve ark., 2017). Bu çalışmada, *hyl* geni için sadece izolat 394 pozitif olarak tespit edilmiştir. Iweriebor ve ark. (2016) tarafından *Ent. faecium* izolatlarının virülans faktörleri üzerine yapılan bir çalışmada, incelenen izolatların hiçbirde *hyl* geninin bulunmadığını belirtilmesine rağmen; İran'da üretilen geleneksel peynirlerden izole edilen *Enterococcus* spp. ile klinik *Enterococcus* spp.'nin karşılaştırıldığı bir çalışmada klinik *Ent. faecium* ve peynir *Ent. faecium* izolatlarının sırasıyla % 77.1 ve % 50 oranlarında bu geni içerdiği bildirilmiştir (Jahansepas ve ark., 2019).

Sonuç olarak, 99 no'lu izolatta virülans faktör bulunmazken 894 no'lu izolatın *gelE, asa1* ve *cylA* olmak üzere üç virülans faktörü barındırdığı ve 394 no'lu izolatın da pozitif beş faktör içerdiği görülürken, daha önceki çalışmalarda bazı araştırmacılar bu tür sonuçların olumsuz bir durum sergilemeyeceğini iddia etmişlerdir. Uzun bir güvenli kullanım geçmişi olan bazı ticari starter enterokok izolatlarının *asa1, ace* ve *gelE* gibi virülans faktörleri içerdiği bilinmektedir, dolayısıyla virülans özelliklerinin varlığı tek başına enterokok enfeksiyonu gelişmesi anlamına gelmediği bildirilmiştir (Zommiti ve ark., 2018; Graham ve ark., 2020). Ayrıca ilginç bir Şekilde *agg* ve *asa1* gibi bazı

virülans faktörler, gastrointestinal sistemde kolonizasyonu ve gelişmeyi iyileştirerek probiyotik potansiyel için faydalı bir rol oynayabilmektedirler (Cebrián ve ark., 2012; Popović ve ark., 2018). Bu nedenle, bu çalışmada elde edilen sonuçlar, enterokok izolatları arasında, izolat 99 ve 894'ün daha ileri *in vivo* probiyotik çalışmalar için probiyotik özellikler ve makul güvenlik özellikleri sergilediğini ortaya koymaktadır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu çalışmada Orta Toroslar bölgesinde bulunan Anamur, Mut, Karaman ve Ereğli yörelerinde geleneksel yöntemler ile üretilen deri tulum peynirlerinden olgunlaşma periyodunun 7, 15, 30, 60, 90 ve 180. günlerinde izole edilen ve genetik karakterizasyonu yapılan *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. ve *Streptococcus* spp.'ye ait toplam 29 adet laktik asit bakteri izolatının bazı gelişme ve probiyotik özellikleri incelenmiştir. Gelişme özellikleri için farklı sıcaklıklarda, farklı alkol konsantrasyonlarında, farklı tuz konsantrasyonlarında, farklı H_2O_2 konsantrasyonlarında gelişme, dondurma ve liyofilizasyona dayanıklılık; probiyotik özellikler için lizozim toleransı, safra ve asit toleransı, gastrik ve pankreatik özsuya dayanıklılık, antimikrobiyel aktivite, bakteriyosin üretimi, diasetil üretimi, β-galaktozidaz aktivitesi, kolesterol asimilasyonu, EPS üretimi, antibiyotik direnci, hemolitik aktivite, biyojen amin üretimi ve virülans gen tespiti analizleri uygulanmıştır. 29 örneğe ait 16S rRNA dizi sonuçlarının BLAST veri tabanında tanımlanması sonucunda; *Lb. brevis* (n=2), *Lb. coryniformis* (n=1), *Lb. helveticus* (n=1), *Lb. paracasei* (n=1), *Lb. plantarum* (n=5), *Lb. rhamnosus* (n=1), *Ent. faecium* (n=10), *S. gallolyticus* (n=2), *S. bovis* (n=1), *S. infantarius* (n=1), *S. lutetiensis* (n=1), *Streptococcus* sp. (n=1) ve *S. thermophilus* (n=2) olarak belirlenmiştir.

Laktik asit bakterilerinin gelişme özellikleri incelendiğinde tüm izolatlar 4 ℃'de herhangi bir gelişme göstermezken 30 ve 45 ℃'de iyi gelişme göstermişlerdir. 15 ℃'de 24, 480, 675 no'lu laktobasil, 12, 277, 894, 702, 382, 1041, 394, 1078, 1050 no'lu enterokok, 932, 120, 937, 1191 ve 375 no'lu streptokok izolatlarında gelişme gözlenmiş olup sadece izolat 894 ve 932'de iyi gelişme tespit edilmiştir.

LAB suşları % 3, 6, 12 ve 15 konsantrasyonlarında alkol içeren ortamda test edilmiş olup % 3 ve 6 konsantrasyonlarda bazı izolatlar zayıf gelişme gösterse de tüm izolatlarda gelişme gözlemlenmiştir. % 12 konsantrasyonda 24, 480 ve 288 no'lu laktobasil dışında hiçbir izolatta gelişme yokken bu üç izolat iyi gelişme göstermişlerdir. % 15 alkol konsantrasyonunda ise sadece laktobasillerde izolat 480 zayıf gelişmiş diğerlerinde herhangi bir gelişme olmamıştır.

İzolatların % 3, 5, 6.5, 8 ve 9 NaCl konsantrasyonlarında gelişimleri incelenmiş ve tüm izolatların % 3 ve 5 konsantrasyonda gelişme gösterdikleri belirlenmiştir. 1270, 16, 184, 15 (laktobasil) ve 932 (streptokok) dışındaki tüm izolatlar % 6.5 konsantrasyonda da gelişme göstermiş olup; laktobasillerde 665, 24, 480, 675, enterokoklarda 99, 1041 ve 1078 no'lu izolatlar % 9 tuz konsantrasyonunu bile tolere edebilmişlerdir. Ancak tüm konsantrasyonlarda sadece 24, 480, 675 no'lu laktobasil izolatları iyi gelişme göstermişlerdir.

Lactobacillus, Enterococcus ve *Streptococcus* spp'ye ait tüm suşlar 0.4, 0.7 ve 1.0 mM H_2O_2 konsantrasyonlarında iyi gelişme göstermişlerdir.

Farklı ortam şartlarında gelişme sonuçları göz önüne alındığında 24, 480 ve 675 no'lu laktobasil izolatlarının ekstrem koşullara karşı daha dirençli olduğu ve gıda endüstrisinde starter kültür olarak kullanıma aday olabileceği görülmektedir.

Dondurma ve liyofilizasyon sonrasında izolatların % canlılıkları sırasıyla 90.89-103.46 ve 88.32-104.05 aralığında tespit edilmiş olup tüm izolatların dondurma ve liyofilizasyon işlemlerinde stabil oldukları gözlemlenmiştir.

Probiyotik bir suşun mideye canlı ulaşması için lizozim gibi ağız boşluğunda bulunan enzimlere karşı dayanıklı olması gerekmektedir. Bu doğrultuda çalışmamızda incelenen LAB izolatlarının lizozim içeren ortamda 30 dk sonraki canlı kalma oranları % 69.13-99.43 arasında değişirken bu oran 120 dk sonunda % 58.62-93.97 aralığında tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan *Streptococcus* izolatlarının *Lactobacillus* ve *Enterococcus* izolatlarına göre daha dirençli olduğu görülmektedir. İzolat 3 laktobasil (665, 1270 ve 288), 4 enterokok (99, 894, 394 ve 1078) ile birlikte tüm streptokok izolatlarının 120 dk sonunda canlı hücre sayıları 6 log kob/mL'nin üzerinde kaldığı ve bu 14 izolatın lizozime karşı en dirençli suşlar olduğu tespit edilmiştir.

İzole edilen laktik asit bakterilerinin asit toleransları, pH'sı 2 ve 3 olan ortamlarda incelenmiştir. Genel olarak bakıldığında çalışmada incelenen *Lactobacillus* spp.'ye ait izolatların asit toleransları daha iyi bulunmuştur. *Enterococcus* ve *Streptococcus* suşlarının hiçbiri 2 saat sonunda pH 2'ye karşı direnç göstermezken 11 *Lactobacillus* izolatından 8'i pH 2'de canlılığını korumuştur. Özellikle 16, 15 ve 675 no'lu laktobasil izolatları 2 saatin sonunda sırasıyla % 94, 93 ve 90 oranında canlılığını koruyarak pH 2'ye karşı en yüksek direnci göstermişlerdir. pH'sı 3 olan ortamda tüm

laktobasil izolatlarının canlı kalma oranları % 80-94 arasında tespit edilmiş ve canlı hücre sayıları 6 log kob/mL'nin üzerinde kalmıştır. pH 3'te 4 enterokok, 4 streptokok izolatı canlılığını korumuştur. Genel olarak bakıldığında pH 2'de 16, 184, 15, 24, 480, 675 no'lu laktobasil izolatları ve pH 3'te ise 277, 894, 394 no'lu enterokok; 932, 120, 1214 no'lu streptokok ve tüm laktobasil izolatları % 50'nin üzerinde bir oranla canlılıklarını koruyarak en yüksek direnci göstermişlerdir.

Laktik asit bakterilerinin safraya karşı dayanıklılıkları % 0.06, 0.125, 0.25, 0.5 ve 1 oranında sığır safrası içeren ortamda incelenmiş ve izolatların bu ortamlardaki canlılıkları sırasıyla % 88.98-99.32, % 83.15-98.06, % 65.62-94.38, % 61.02-89.94 ve % 58.09-90.68 aralığında tespit edilmiştir. Safra oranı arttıkça izolatların canlı kalabilirlikleri azalmıştır. Genel olarak *Lactobacillus* izolatları % 0.25, 0.5 ve 1 oranlarında *Enterococcus* ve *Streptococcus* izolatlarına göre daha az canlılık göstermiştir. Bununla birlikte tüm izolatlar % 1 oaranında safra içeren ortamda bile canlı kalabilme oranlarını % 50'nin üzerinde korumuştur.

LAB izolatlarının gastrik direncini belirlemek için pepsin ve lizozim içeren bir ortam oluşturulmuş ve pH'sı 2.5'a ayarlanarak 3 saat sonunda laktik asit bakterilerinin bu ortamda canlı kalabilirlikleri hesaplanmıştır. Sırasıyla % 97.87, 96.05 ve 85.60 canlılık oranına sahip 1030, 480 ve 665 no'lu *Lactobacillus* izolatları gastrik koşullara karşı en yüksek direnç gösteren izolatlardır. Bununla birlikte tüm laktobasil suşlarının gastrik ortamda canlı kalabilirlikleri % 50'nin üzerindeyken, enterokok izolatları arasında 99, 277, 894, 702, 1041, 394, 1078 ve streptokok izolatları arasında da sadece 930 % 50'nin üzerinde bir oranda canlılığını koruyabilmiştir.

Laktik asit bakterilerinin pankreatik ortama direnci, 8 pH'ya sahip pankreatin ve safra tuzları içeren bir ortamda incelenmiş ve tüm izolatların % 80'in üzerinde canlılık göstererek pankreatine karşı yüksek bir dirence sahip oldukları tespit edilmiştir.

Çalışmada laktik asit bakterilerinin adhezyon kabiliyetlerini incelemek için otoagregasyon ve hücre yüzeyi hidrofobisite özelliklerine bakılmıştır. Yüzey hidrofobikliğini belirlemek için hidrokarbon olarak n-hekzadekan ve ksilen kullanılmıştır. Yüksek hidrofobiklik sergileyen bakteri hücrelerinin mukus veya epitel hücreleri ile güçlü etkileşim oluşturduğu ve bu özelliğin insan gastrointestinal sisteminde varlığını koruyabilmesi için bakteriye önemli bir avantaj sağlayabildiği

bilinmektedir. Bu bağlamda 3 *Lactobacillus* (15, 449 ve 24), 4 *Enterococcus* (99, 1041, 394 ve 1050) ve 4 *Streptococcus* (1046, 930, 937 ve 1191) izolatının n-hekzadekan ve ksilene karşı yüksek hidrofobisite değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca streptokok izolatı 1214'ün sadece n-hekzadekan'a karşı; 12, 277 ve 1078 no'lu enterokok izolatlarının ise sadece ksilene karşı yüksek hidrofobiklik sergilediği tespit edilmiştir.

Probiyotik mikroorganizmalar, yığınlar oluşturarak patojenlerin insan gastrointestinal sistemindeki adhezyon bölgelerine yapışmalarını engelleyebilirler. Bu amaçla gerçekleştirilen otoagregasyon testinde LAB suşlarının 3 ve 24 saat sonraki otoagregasyon yüzdeleri hesaplanmış ve sırasıyla % 7.44-43.19 ve % 2.53-53.87 aralığında tespit edilmiştir. Sonuçlar literatürde incelenen ticari probiyotik suşların agregasyon yüzdeleri ile karşılaştırıldığında bu projede incelenen 29 izolattan 21'inin daha yüksek değerlere sahip olduğu belirlenmiştir.

İzolatların *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel aktiviteleri incelenmiştir. *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028' e karşı hiçbir izolat antibakteriyal etki göstermemesine rağmen 16, 184 (laktobasil) ve 375 (streptokok) dışındaki tüm izolatların *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'a karşı antibakteriyal zon oluşturduğu gözlemlenmiştir. *Listeria monocytogenes* ATCC 7644'karşı 10 izolat (15 ve 449 no'lu laktobasil, 277, 894, 702, 1041 ve 394 no'lu enterokok, 1046, 932 ve 375 no'lu streptokok), *Bacillus cereus* ATCC 11778'e karşı 2 izolat (streptokok 120 ve 930) ve *Escherichia coli* ATCC 25922'e karşı sadece 1 izolat (streptokok 675) antibakteriyal etki oluşturmuştur. 16 ve 184 no'lu laktobasil izolatları 5 indikatör patojene karşıda antibakteriyal etki göstermemiş olup 3 laktobasil (15, 449, 675), 4 enterokok (894, 702, 1041, 394), 4 streptokok (1046, 932, 120 ve 930) izolatı iki farklı patojene karşı antibakteriyal aktivite sergilemiştir.

Çalışmada kullanılan LAB'ın bakteriyosin ve benzeri metabolit üretim özellikleri incelenmiş, genel inhibisyonun diğer etkenlerden kaynaklandığı ve seçilen kültürler tarafından bakteriyosin ve benzeri maddeler üretilmediği sonucuna ulaşılmıştır.

Tez çalışmamızda incelenen 29 laktik asit bakterisi diasetil üretimi açısından analiz edilmiş ve sadece 4 laktobasil izolatında (665, 1030, 480, 675) bu özellik tespit edilmemiştir. Diasetil üreten izolatlardan 10'unda zayıf üretim (1270, 184, 15, 449, 24 no'lu laktobasil, 894 ve 1050 no'lu enterokok, 932, 120 ve 1191 no'lu streptokok), 7'sinde orta (12, 277, 702, 1041 no'lu enterokok, 1046, 930 ve 937 no'lu streptokok), 8'inde kuvvetli (16, 288 no'lu laktobasil, 99, 382, 394, 1078 no'lu enterokok, 375 ve 1214 no'lu streptokok) üretim tespit edilmiştir.

Mevcut çalışmada suşların β-galaktosidaz aktivitesi incelenmiş ve 1030, 1270, 24 ve 48 no'lu laktobasil izolatlarının yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığı üzerindeki yararlı etkilerinden biride serum kolestrolü üzerindeki olumlu etkileridir. Yapılan çalışmalar LAB'ların kolesterol düşürücü etkisinin bulunduğu ve bu kültürler ile fermente edilen süt ürünlerinin kolesterol düşürmede ilaçlara alternatif kullanılabileceğini göstermiştir. Litaratürde incelenen ticari probiyotiklerin kolesterol asimilasyon yüzdesi ile karşılaştırıldığında enterokoklarda 1041 ve 1078, streptokoklarda 1046, 932, 937 ve 1191 dışındaki tüm izolatların daha yüksek değerlere sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak çalışmamızda laktobasillerde 184, 1030, 15, 16, 288, 665, streptokoklarda 675, enterokoklarda 99 ve 12 no'lu izolatların kolesterol asimilasyon değeri % 40'ın üzerinde bulunmuştur ve serum kolesterol seviyesinin düşürülmesinde diğer izolatlara göre daha iyi bir etkiye sahip olduğu görülmektedir.

LAB izolatlarından EPS izolasyonu yapılarak fenol-sülfirik asit yöntemiyle miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre tüm izolatların EPS üretebildiği ve EPS miktarının 198.48-531.17 µg/mL arasında değiştiği tespit edilmiştir.

Probiyotiklerin antibiyotik direnci, gen transferi riski mevcut olduğunda bu genleri transpozonlar ve plazmidler yoluyla bağırsaktaki istenmeyen bakterilere aktarabildikleri için potansiyel probiyotik bakterilerin kullanımını kısıtlayabilecek önemli bir güvenlik sorunu olarak kabul edilmektedir. Çalışmada 24 480 ve 288 dışındaki tüm *Lactobacillus* izolatları amfisilin, kloramfenikol eritromisin penisilin ve tetrasikline karşı hassasiyet göstermiştir. Ayrıca amfisilin, kloramfenikol, penisilin, tetrasiklin ve vankomsine karşı 1050 dışındaki tüm *Enterococcus* spp'nin hassasiyet gösterdiği; 937 ve 1214 haricindeki *Streptococcus* spp'ninde amfisilin, kloramfenikol,

penisilin ve vankomsine karşı hassas olduğu belirlenmiştir. Öte yandan tüm izolatlarda gentamisin, kanamisin ve streptomisine karşı direnç tespit edilmiştir.

İncelenen LAB suşları, probiyotiklerin güvenlik kriterlerinden olan hemolitik aktivite ve biyojen amin üretimi açısından incelenmiş ve tüm suşlar ɣ-hemolitik olarak belirlenmiştir. Arjinin, lisin, ornitin ve tirosin ilave edilerek gerçekleştirilen biyojen amin üretim analizinde sadece arjinin içeren sıvı besiyerlerinde bazı izolatların biyojen amin oluşturduğu tespit edilmiştir. 4 laktobasil (665, 1030, 1270, 15), 4 enterokok (277, 1041, 394, 1050), 2 streptokok (120 ve 937) izolatının arjinin dekarboksilaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Ancak bu izolatların oluşturduğu biyojen amin miktarı tespit edilerek insan vücudunda toksik etkiye yol açacak düzeyde olup olmadığı belirlenmelidir.

Çalışmamızda, gastrointestinal direnç, adhezyon yeteneği ve bazı fonksiyonel özellikler üzerine yapılan analizler sonucunda, *Enterococcus* spp. arasında en potansiyel probiyotik suş olan 99, 394 ve 894 no'lu izolatlar virülans özellikleri açısından incelenmiş ve jelatinaz (gelE), agregasyon maddesi (asa1), hiyalüronidaz (hyl_{efm}) ve sitolizin (*CylA*) aktivatörü, sitolizin taşınması (*CylB*), sitolizin öncülleri ($CylL_L$ ve $CylL_s$), sitolizin modifikasyonu (*CyllM*) genlerinin varlığına bakılmıştır. Elde edilen sonuçlarda izolat 99'da virülans gen tespit edilmemiştir. Test edilen izolat 394 ve 894'ün her ikisi de jelE ve cylA genleri barındırmaktadır. Ayrıca izolat 394 cylL1,2, cylM ve Hyl_{efm} virülans genlerine sahipken izolat 894, asal geni için pozitif olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak 99 no'lu izolat hiç virülans gen içermezken izolat 894'te 3 394'te ise 5 virülans gen belirlenmiştir. Literatürde bazı ticari *Enterococcus* izolatının bazı virülans faktörleri içerebildiği dolayısıyla virülans özelliklerinin varlığı tek başına enterokok enfeksiyonu gelişmesi anlamına gelmediği bildirilmiştir. Bu bağlamda 99 ve 894 no'lu izolatların probiyotik aday olabileceği ve ileri *in vivo* çalışmalarda kullanılabileceği düşünülmektedir.

Tüm sonuçlar göz önüne alındığında *Lactobacillus* spp. arasında en yüksek probiyotik özellik gösteren *Lb. plantarum* izolat 15, pH 2 ve 3 asit ortamında, mide ve pankreatik ortamda canlılığını korumuş, yüksek hidrofobisite ve agregasyon yeteneği sergilemiş, 2 patojen mikroorganizmaya (*L. monocytogenes* ATCC 7644 ve *Staph. aureus* ATCC 25923) karşı antimikrobiyel etki göstermiş, hem yüksek kolesterol asimilasyonu hem de EPS üretimi gerçekleştirmiştir. Ayrıca güvenlik kriterleri göz

önüne alındığında hemolitik aktivite göstermemiş olup sadece arjinin dekarboksilasyonu meydana gelmiştir. Bu nedenle üretilen biyojen amin miktarının tespit edilerek toksik etki oluşturacak düzeyde olup olmadığı tespit edilmelidir. Bu izolat gentamisin, kanamisin, streptomisin ve vankomisine karşı direnç göstermiş olmasına rağmen bu antibiyotiklere karşı *Lactobacillus* türlerinin doğal dirence sahip olduğu bilinmekte ve aktarılabilir direnç genleri olmadığı düşünülmektedir.

Enterococcus spp. arasında *Ent. faecium* izolat 99 ve 894 en yüksek probiyotik potansiyel göstermiş olup ileri çalışmalar için probiyotik aday olarak gösterilebilir. *Ent. faecium* izolat 99 mide ve pankreatik ortamda canlılığını korumuş, yüksek adhezyon özelliği sergilemiş, *Staph. aureus* ATCC 25923'e karşı antimikrobiyel etki göstermiş olup hem yüksek kolesterol asimilasyonu hemde EPS üretimi tespit edilmiştir. Ayrıca güvenlik değerlendirilmesinde hemolitik aktivite göstermemiş ve biyojen amin üretimi gerçekleştirmemiştir. Tüm bunlara ilaveten virülans gen içermemektedir.

Ent. faecium izolat 894 mide, pankreas ve pH 3 asit ortamında canlılık göstermiş olup yüksek otoagregasyon yeteneğine sahiptir. Ayrıca *L. monocytogenes* ATCC 7644 ve *Staph. aureus* ATCC 25923 patojenlerine karşı antibakteriyal etki göstermekte ve EPS üretebilmektedir. Hemolitik aktivite ve biyojen amin üretimi göstermemiş olup içerdiği virülans genlerin silik olduğu ve enfeksiyona yol açmayacağı düşünülmektedir. Probiyotik potansiyeli olan 2 *Enterococcus* izolatınında aktarılabilir direnç genlerinin tespiti için ileri genomik çalışmalar düşünülmelidir.

Streptococcus izolatları, *Lactobacillus* ve *Enterococcus* izolatlarına göre yüksek potansiyel göstermemiştir. Ancak kendi aralarında değerlendirildiğinde *S. infantarius* izolat 930 mide ve pankreatik ortamda canlı kalabilirlik, yüksek hidrofobisite özelliği 2 patojene karşı antimikrobiyel aktivite ve EPS üretimi göstermiş olup diğer *Streptococcus* izolatlarına göre yüksek probiyotik potansiyel sergilemektedir. Ayrıca güvenlik açısından sorun teşkil etmemekle birlikte içerdiği antibiyotik direnç genlerinin *Streptococcus* türlerinde doğal direnç genleri olduğu bilinmekte ve aktarılabilir gen olduğu düşünülmemektedir.

5.2. Öneriler

Geleneksel ürünlerimizden izole ettiğimiz laktik asit bakterilerinin, teknolojik ve fonksiyonel özelliklerinin saptanıp gıda endüstrisinde kullanımına sunulması amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada 30 laktik asit bakteri suşu arasından *Lb. plantarum* izolat 15, *Ent. faecium* izolat 99, *Ent. faecium* izolat 894 ve *S. infantarius* izolat 930 olmak üzere 4 suşun probiyotik potansiyel gösterdiği ve yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada yapılan ve ileride yapılmasına gereksinim duyulan *in vitro* analizler ile probiyotik özellikleri bakımından öne çıkan bu dört suşun probiyotik olabilmesi için önemli veriler sağlanmaktadır. Ancak bu veriler bu suşlara "probiyotik" denilebilmesi için henüz yetersiz verilerdir. Probiyotik özellikler bakımından ön plana çıkan bu suşların; uygun gelişim koşullarının incelenmesi, endüstriyel üretim süreçlerine uygunluğunun belirlenmesi, genomik ve proteomik karakteristiklerinin tanımlanması gibi daha pek çok *in vitro, in vivo* ve *in sitü* analizleri yapılarak canlı sistemler ve gıda sitemlerindeki davranışlarının belirlenmesi uygun olacaktır. Bu süreçlerin tamamlanması halinde probiyotik olarak nitelendirilebilme ve patentlenebilme olasılığı bulunmaktadır.

Probiyotik özellikler bakımından yetersiz bulunan ancak yüksek fonksiyonel özelliğe sahip olduğu tespit edilen (yüksek kolesterol asimilasyonu ve β-galaktosidaz aktivitesi) ve güvenli açısından sorun teşkil etmeyen suşlar enkapsülasyon yöntemleri ile gıda uygulamalarında kullanılabilir. Buradaki amaç asitliğe karşı hassas olan bu suşların intestinal sistemde daha uzun süre canlı kalmalarını sağlayarak potansiyel sağlık etkilerinden yararlanmaktır. Dolayısıyla, bu suşların gıda formülasyonlarında kullanılması yeni fonksiyonel gıdaların gelişimine imkan tanıyacaktır.

Ekstrem koşullarda gelişme özellikleri incelenen LAB izolatlarından *Lb. plantarum* izolat 24, 480 ve 675'in özellikle 15 ℃'de gelişebilmesi ve % 9 NaCl konsantrasyonunu tolere edebilmelerinden dolayı süt ürünleri dışında zeytin ve turşu gibi asidik fermente gıdalarda starter kültür olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Ancak bu hususta özellikle *Lb. plantarum* izolat 24 ve 480'in güvenlik özellikleri daha detaylı olarak incelenmelidir. Antibiyotik direnç genlerinin silik genler olup olmadığı tespit edildikten sonra bu suşların fermente gıdalarda kullanımı değerlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N. P. ve Ayyash, M., 2017, Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk, *LWT-food Science and Technology*, 79, 316-325.

Adesulu-Dahunsi, A., Jeyaram, K. ve Sanni, A., 2018, Probiotic and technological properties of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from cereal-based nigerian fermented food products, *Food Control*, 92, 225-231.

Adnan, M., Patel, M. ve Hadi, S., 2017, Functional and health promoting inherent attributes of Enterococcus hirae F2 as a novel probiotic isolated from the digestive tract of the freshwater fish Catla catla, *PeerJ*, 5, e3085.

Aloğlu, H. ve Öner, Z., 2006, Assimilation of cholesterol in broth, cream, and butter by probiotic bacteria, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108 (9), 709-713.

Ammor, M. S., Flórez, A. B. ve Mayo, B., 2007, Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria, *Food microbiology*, 24 (6), 559-570.

Angmo, K., Kumari, A. ve Bhalla, T. C., 2016, Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh, *LWT-food Science and Technology*, 66, 428-435.

Araya, M., Reid, G., Sanders, M. ve Stanton, C., 2002, Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Jt. FAO/WHOWork, *Group, London, Ontario*.

Archimbaud, C., Shankar, N., Forestier, C., Baghdayan, A., Gilmore, M. S., Charbonné, F. ve Joly, B., 2002, In vitro adhesive properties and virulence factors of Enterococcus faecalis strains, *Research in microbiology*, 153 (2), 75-80.

Ayyash, M., Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., Enan, M., El-Tarabily, K. ve Shah, N., 2018, In-vitro investigation into probiotic characterisation of Streptococcus and Enterococcus isolated from camel milk, *LWT*, 87, 478-487.

Baccouri, O., Boukerb, A. M., Farhat, L. B., Zébré, A., Zimmermann, K., Domann, E., Cambronel, M., Barreau, M., Maillot, O. ve Rincé, I., 2019, Probiotic potential and safety evaluation of Enterococcus faecalis OB14 and OB15, isolated from traditional tunisian testouri cheese and rigouta, using physiological and genomic analysis, *Frontiers in microbiology*, 10 (881), 1-15.

Başdoğan, M. G., 2020, Geleneksel Olarak Üretilen Turşulardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Potansiyelinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, 111s.

Baumgartner, A., Kueffer, M., Simmen, A. ve Grand, M., 1998, Relatedness ofLactobacillus rhamnosusStrains Isolated from Clinical Specimens and Such from Food-stuffs, Humans and Technology, *LWT-food Science and Technology*, 31 (5), 489-494.

Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F., Rantsiou, K., Jiménez-Díaz, R., Garrido-Fernández, A. ve Cocolin, L., 2013, Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential, *Food Research International*, 50 (1), 135-142.

Belgacem, Z. B., Abriouel, H., Omar, N. B., Lucas, R., Martínez-Canamero, M., Gálvez, A. ve Manai, M., 2010, Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic Enterococcus faecium from artisanal Tunisian fermented meat, *Food Control*, 21 (4), 462-470.

Ben Braïek, O., Morandi, S., Cremonesi, P., Smaoui, S., Hani, K. ve Ghrairi, T., 2018, Biotechnological potential, probiotic and safety properties of newly isolated enterocin-producing Enterococcus lactis strains, *LWT*, 92, 361-370.

Bernardeau, M., Vernoux, J. P., Henri-Dubernet, S. ve Gueguen, M., 2008, Safety assessment of dairy microorganisms: the Lactobacillus genus, *International journal of food microbiology*, 126 (3), 278-285.

Billström, H., Lund, B., Sullivan, Å. ve Nord, C. E., 2008, Virulence and antimicrobial resistance in clinical Enterococcus faecium, *International journal of antimicrobial agents*, 32 (5), 374-377.

Boonaert, C. J. ve Rouxhet, P. G., 2000, Surface of lactic acid bacteria: relationships between chemical composition and physicochemical properties, *Applied and environmental microbiology*, 66 (6), 2548-2554.

Boricha, A. A., Shekh, S. L., Pithva, S. P., Ambalam, P. S. ve Vyas, B. R. M., 2019, In vitro evaluation of probiotic properties of Lactobacillus species of food and human origin, *LWT*, 106, 201-208.

Bover-Cid, S. ve Holzapfel, W. H., 1999, Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria, *International journal of food microbiology*, 53 (1), 33-41.

Böke, H., 2005, Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus türüne ait susların bazı probiyotik özelliklerinin belirlenmesi ve tutuklamanın bu özellikler üzerine etkisi, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.

Campana, R., van Hemert, S. ve Baffone, W., 2017, Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion, *Gut pathogens*, 9 (1), 1-12.

Cebrián, R., Baños, A., Valdivia, E., Pérez-Pulido, R., Martínez-Bueno, M. ve Maqueda, M., 2012, Characterization of functional, safety, and probiotic properties of Enterococcus faecalis UGRA10, a new AS-48-producer strain, *Food microbiology*, 30 (1), 59-67.

Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A. ve Łaniewska-Trokenheim, Ł., 2017, Virulence factors of Enterococcus spp. presented in food, *LWT*, 75, 670-676.

Chang, J. H., Shim, Y., Cha, S. K. ve Chee, K., 2010, Probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from kimchi, *Journal of Applied Microbiology*, 109 (1), 220-230.

Charalampopoulos, D., Pandiella, S. ve Webb, C., 2003, Evaluation of the effect of malt, wheat and barley extracts on the viability of potentially probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions, *International journal of food microbiology*, 82 (2), 133-141.

Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L. ve Collins, J. K., 1998, Antibiotic susceptibility of potentially probiotic Lactobacillus species, *Journal of Food Protection*, 61 (12), 1636-1643.

Clewell, D. B., 1993, Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer.

Cockerill, F., Patel, J., Alder, J., Bradford, P., Dudley, M. ve Eliopoulos, G., 2013, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement; M100-S23, *Wayne, PA: CLSI*.

Collado, M. C., Meriluoto, J. ve Salminen, S., 2008, Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains, *European food research and technology*, 226 (5), 1065-1073.

Comunian, R., Daga, E., Dupré, I., Paba, A., Devirgiliis, C., Piccioni, V., Perozzi, G., Zonenschain, D., Rebecchi, A. ve Morelli, L., 2010, Susceptibility to tetracycline and erythromycin of Lactobacillus paracasei strains isolated from traditional Italian fermented foods, *International journal of food microbiology*, 138 (1-2), 151-156.

Corredoira, J., Alonso, M. P., Coira, A. ve Varela, J., 2008, Association between Streptococcus infantarius (formerly S. bovis II/1) bacteremia and noncolonic cancer, *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (4), 1570-1570.

Cueva, C., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Álvarez, P. J., Bills, G., Vicente, M. F., Basilio, A., Rivas, C. L., Requena, T., Rodríguez, J. M. ve Bartolomé, B., 2010, Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria, *Research in microbiology*, 161 (5), 372-382.

Culligan, E. P., Hill, C. ve Sleator, R. D., 2009, Probiotics and gastrointestinal disease: successes, problems and future prospects, *Gut pathogens*, 1 (1), 19.

Çon, A. H. ve Gökalp, H. Y., 2000, Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Metabolitleri ve Etki fiekilleri.

Danielsen, M. ve Wind, A., 2003, Susceptibility of Lactobacillus spp. to antimicrobial agents, *International journal of food microbiology*, 82 (1), 1-11.

de Almeida, C. V., Taddei, A. ve Amedei, A., 2018, The controversial role of Enterococcus faecalis in colorectal cancer, *Therapeutic advances in gastroenterology*, 11, 1756284818783606.

de Almeida Júnior, W. L. G., da Silva Ferrari, Í., de Souza, J. V., da Silva, C. D. A., da Costa, M. M. ve Dias, F. S., 2015, Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk, *Food Control*, 53, 96-103.

de Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Júnior, A. I. M., Thomaz-Soccol, V. ve Soccol, C. R., 2018, How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria, *Biotechnology advances*, 36 (8), 2060-2076.

de Souza Leone, R., de Andrade, E. F., Ellendersen, L. N., da Cunha, A. T., Martins, A. M. C., Granato, D. ve Masson, M. L., 2017, Evaluation of dried yacon (Smallanthus sonchifolius) as an efficient probiotic carrier of Lactobacillus casei LC-01, *LWT*, 75, 220-226.

De Vuyst, L., Moreno, M. F. ve Revets, H., 2003, Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins, *International journal of food microbiology*, 84 (3), 299-318.

De Vuyst, L. ve Tsakalidou, E., 2008, Streptococcus macedonicus, a multi-functional and promising species for dairy fermentations, *International Dairy Journal*, 18 (5), 476-485.

Dertli, E., 2013, Biochemistry and functional analysis of exopolysaccharide production in Lactobacillus johnsonii, *School of Biological Sciences*.

Devirgiliis, C., Barile, S. ve Perozzi, G., 2011, Antibiotic resistance determinants in the interplay between food and gut microbiota, *Genes & nutrition*, 6 (3), 275-284.

Ding, W., Shi, C., Chen, M., Zhou, J., Long, R. ve Guo, X., 2017, Screening for lactic acid bacteria in traditional fermented Tibetan yak milk and evaluating their probiotic and cholesterol-lowering potentials in rats fed a high-cholesterol diet, *Journal of Functional Foods*, 32, 324-332.

Divya, J. B., Varsha, K. K. ve Nampoothiri, K. M., 2012, Newly isolated lactic acid bacteria with probiotic features for potential application in food industry, *Applied biochemistry and biotechnology*, 167 (5), 1314-1324.

Domingos-Lopes, M., Stanton, C., Ross, P., Dapkevicius, M. ve Silva, C., 2017, Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese, *Food microbiology*, 63, 178-190.

Doron, S. ve Snydman, D. R., 2015, Risk and safety of probiotics, *Clinical Infectious Diseases*, 60 (suppl_2), S129-S134.

Dos Santos, K. M. O., de Matos, C. R., Salles, H. O., de Melo Franco, B. D. G., Arellano, K., Holzapfel, W. H. ve Todorov, S. D., 2020, Exploring Beneficial/Virulence Properties of Two Dairy-Related Strains of Streptococcus infantarius subsp. infantarius, *Probiotics and antimicrobial proteins*, 1-18.

Duary, R. K., Rajput, Y. S., Batish, V. K. ve Grover, S., 2011, Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells, *The Indian journal of medical research*, 134 (5), 664.

Duboc, P. ve Mollet, B., 2001, Applications of exopolysaccharides in the dairy industry, *International Dairy Journal*, 11 (9), 759-768.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. t. ve Smith, F., 1956, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical chemistry*, 28 (3), 350-356.

Dueñas-Chasco, M. T., Rodríguez-Carvajal, M. A., Tejero-Mateo, P., Espartero, J. L., Irastorza-Iribas, A. ve Gil-Serrano, A. M., 1998, Structural analysis of the exopolysaccharides produced by Lactobacillus spp. G-77, *Carbohydrate Research*, 307 (1-2), 125-133.

Dunn-Emke, S., Weidner, G. ve Ornish, D., 2001, Benefits of a low-fat plant-based diet, *Obesity*, 9 (11), 731.

Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G. ve Daly, C., 2001, In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings, *The American journal of clinical nutrition*, 73 (2), 386s-392s.

Eaton, T. J. ve Gasson, M. J., 2001, Molecular screening of Enterococcusvirulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates, *Applied and environmental microbiology*, 67 (4), 1628-1635.

Eaton, T. J., Gasson, M. J. J. A. ve microbiology, e., 2001, Molecular screening of Enterococcusvirulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates, 67 (4), 1628-1635.

EFSA, P. o. A. P. o. S. u. i. A. F., Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M. d. L., Bories, G., Chesson, A., Cocconcelli, P. S. ve Flachowsky, G., 2018, Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms, *EFSA Journal*, 16 (3), e05206.

Eken, H., 2019, Fermente Sucuktan İzole Edilen Lactobacillus sakei subsp. carnosus ve Lactobacillus sakei subsp. sakei Suşlarının Bazı Probiyotik ve Endüstriyel Özelliklerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, *Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, 64s.

Elli, M., Zink, R., Rytz, A., Reniero, R. ve Morelli, L., 2000, Iron requirement of Lactobacillus spp. in completely chemically defined growth media, *Journal of Applied Microbiology*, 88 (4), 695-703.

Ertekin, Ö., 2007, Farklı Gıdalardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Nümerik Taksonomisi, Yüksek Lisans Tezi, *Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Üniversitesi*, Denizli, 176s.

Ertekin, Ö. ve Çon, A. H., 2014, Farklı gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin endüstriyel ve probiyotik özellikleri, *Akademik Gıda*, 12 (4), 6-16.

FAO/WHO, 2002, Guidelines for the evaluation of probiotics in food, *FAO/WHO, London, ON*.

Feld, L., Schjørring, S., Hammer, K., Licht, T. R., Danielsen, M., Krogfelt, K. ve Wilcks, A., 2008, Selective pressure affects transfer and establishment of a Lactobacillus plantarum resistance plasmid in the gastrointestinal environment, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61 (4), 845-852.

Fguiri, I., Ziadi, M., Rekaya, K., Samira, A. ve Khorchani, T., 2017, Isolation and characterization of lactic acid bacteria strains from raw Camel Milk for Potential Use in the Production of Yogurt, *J. Food Sci. Nutr*, 3, 1-8.

Fiorda, F. A., de Melo Pereira, G. V., Thomaz-Soccol, V., Medeiros, A. P., Rakshit, S. K. ve Soccol, C. R., 2016, Development of kefir-based probiotic beverages with DNA protection and antioxidant activities using soybean hydrolyzed extract, colostrum and honey, *LWT-food Science and Technology*, 68, 690-697.

Floch, M. H., 2013, Probiotic safety and risk factors, *Journal of clinical gastroenterology*, 47 (5), 375-376.

Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Munoz-Quezada, S. ve Gil, A., 2013, Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics, *British journal of nutrition*, 109 (S2), S35-S50.

Franz, C. M., Stiles, M. E., Schleifer, K. H. ve Holzapfel, W. H., 2003, Enterococci in foods—a conundrum for food safety, *International journal of food microbiology*, 88 (2-3), 105-122.

Franz, C. M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W. ve Gálvez, A., 2011, Enterococci as probiotics and their implications in food safety, *International journal of food microbiology*, 151 (2), 125-140.

Fuller, R., 1989, Probiotics in man and animals, *Journal of applied bacteriology*, 66 (5), 365-378.

Fuller, R., 1992, History and development of probiotics, In: Probiotics, Eds: Springer, p. 1-8.

G-Alegría, E., López, I., Ruiz, J. I., Sáenz, J., Fernández, E., Zarazaga, M., Dizy, M., Torres, C. ve Ruiz-Larrea, F., 2004, High tolerance of wild Lactobacillus plantarum and Oenococcus oeni strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol, *FEMS Microbiology Letters*, 230 (1), 53-61.

García-Hernández, Y., Pérez-Sánchez, T., Boucourt, R., Balcázar, J. L., Nicoli, J. R., Moreira-Silva, J., Rodríguez, Z., Fuertes, H., Nuñez, O. ve Albelo, N., 2016, Isolation, characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production, *Research in Veterinary Science*, 108, 125-132.

Gardiner, G. E., Ross, R. P., Wallace, J. M., Scanlan, F. P., Jägers, P. P., Fitzgerald, G. F., Collins, J. K. ve Stanton, C., 1999, Influence of a probiotic adjunct culture of Enterococcus faecium on the quality of cheddar cheese, *Journal of agricultural and food chemistry*, 47 (12), 4907-4916.

Georgalaki, M., Sarantinopoulos, P., Ferreira, E., De Vuyst, L., Kalantzopoulos, G. ve Tsakalidou, E., 2000, Biochemical properties of Streptococcus macedonicus strains isolated from Greek Kasseri cheese, *Journal of Applied Microbiology*, 88 (5), 817-825.

Gilliland, S., 1979, Beneficial Interrelationships Between Certain Microorganisms and Humans: Candidate Microorganisms for Use as Dietary Adjuncts 1, 2, *Journal of Food Protection*, 42 (2), 164-167.

Gourbeyre, P., Denery, S. ve Bodinier, M., 2011, Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions, *Journal of leukocyte biology*, 89 (5), 685-695.

Graham, K., Stack, H. ve Rea, R., 2020, Safety, beneficial and technological properties of enterococci for use in functional food applications–a review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-26.

Guarino, A., Quigley, E. M. ve Walker, W. A., 2013, Probiotic bacteria and their effect on human health and well-being, Karger Medical and Scientific Publishers, p.

Guarner, F. ve Malagelada, J.-R., 2003, Gut flora in health and disease, *The Lancet*, 361 (9356), 512-519.

Gueimonde, M., Sánchez, B., de los Reyes-Gavilán, C. G. ve Margolles, A., 2013, Antibiotic resistance in probiotic bacteria, *Frontiers in microbiology*, 4, 202.

Gut, A. M., Vasiljevic, T., Yeager, T. ve Donkor, O. N., 2019, Characterization of yeasts isolated from traditional kefir grains for potential probiotic properties, *Journal of Functional Foods*, 58, 56-66.

Gutiez, L., Borrero, J., Jimenez, J. J., Gomez-Sala, B., Recio, I., Cintas, L. M., Herranz, C. ve Hernandez, P. E., 2014, Genetic and biochemical evidence that recombinant Enterococcus spp. strains expressing gelatinase (GelE) produce bovine milk-derived hydrolysates with high angiotensin converting enzyme-inhibitory activity (ACE-IA), *Journal of agricultural and food chemistry*, 62 (24), 5555-5564.

Halász, A., Baráth, Á., Simon-Sarkadi, L. ve Holzapfel, W., 1994, Biogenic amines and their production by microorganisms in food, *Trends in Food Science & Technology*, 5 (2), 42-49.

Hammad, A. M., Hassan, H. A. ve Shimamoto, T., 2015, Prevalence, antibiotic resistance and virulence of Enterococcus spp. in Egyptian fresh raw milk cheese, *Food Control*, 50, 815-820.

Han, J., Chen, D., Li, S., Li, X., Zhou, W.-W., Zhang, B. ve Jia, Y., 2015, Antibiotic susceptibility of potentially probiotic Lactobacillus strains, *Italian Journal of Food Science*, 27 (3), 282-289.

Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K. ve Hammami, R., 2018, The genus Enterococcus: Between probiotic potential and safety concerns—An update, *Frontiers in microbiology*, 9, 1791.

Hashemi, S. M. B., Shahidi, F., Mortazavi, S. A., Milani, E. ve Eshaghi, Z., 2014, Potentially probiotic Lactobacillus strains from traditional Kurdish cheese, *Probiotics and antimicrobial proteins*, 6 (1), 22-31.

Hollenbeck, B. L. ve Rice, L. B., 2012, Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus, *Virulence*, 3 (5), 421-569.

Huddleston, J. R., 2014, Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes, *Infection and drug resistance*, 7, 167.

Hummel, A. S., Hertel, C., Holzapfel, W. H. ve Franz, C. M., 2007, Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria, *Applied and environmental microbiology*, 73 (3), 730-739.

İspirli, H., 2016, Erzincan Tulum Peynirinden Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) İzolasyonu, Moleküler Metotlarla Tanımlanması ve Ekzopolisakkarit (EPS) Üretim Potansiyellerinin Genetik Olarak Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Bayburt Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, 125s.

Iweriebor, B. C., Obi, L. C. ve Okoh, A. I., 2016, Macrolide, glycopeptide resistance and virulence genes in Enterococcus species isolates from dairy cattle, *Journal of medical microbiology*, 65 (7), 641-648.

Iyer, R., Tomar, S., Maheswari, T. U. ve Singh, R., 2010, Streptococcus thermophilus strains: Multifunctional lactic acid bacteria, *International Dairy Journal*, 20 (3), 133-141.

Jacobsen, L., Wilcks, A., Hammer, K., Huys, G., Gevers, D. ve Andersen, S. R., 2007, Horizontal transfer of tet (M) and erm (B) resistance plasmids from food strains of Lactobacillus plantarum to Enterococcus faecalis JH2-2 in the gastrointestinal tract of gnotobiotic rats, *FEMS microbiology ecology*, 59 (1), 158-166.

Jahansepas, A., Sharifi, Y., Aghazadeh, M. ve Rezaee, M. A., 2019, Comparative analysis of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium strains isolated from clinical samples and traditional cheese types in the Northwest of Iran: antimicrobial susceptibility and virulence traits, *Archives of Microbiology*, 1-8.

Jampaphaeng, K., Cocolin, L. ve Maneerat, S., 2017, Selection and evaluation of functional characteristics of autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditional fermented stinky bean (Sataw-Dong), *Annals of Microbiology*, 67 (1), 25-36.

Jiménez, E., Ladero, V., Chico, I., Maldonado-Barragán, A., López, M., Martín, V., Fernández, L., Fernández, M., Álvarez, M. A. ve Torres, C., 2013, Antibiotic resistance, virulence determinants and production of biogenic amines among enterococci from ovine, feline, canine, porcine and human milk, *BMC microbiology*, 13 (1), 288.

Johnson, A. P., 1994, The pathogenicity of enterococci, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 33 (6), 1083-1089.

Karasu, N., 2006, Turşu ve zeytinden antagonistik ve probiyotik özellikte laktik starter kültür eldesi, Yüksek Lisans Tezi, *Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, 88s.

Khan, H., Flint, S. ve Yu, P.-L., 2010, Enterocins in food preservation, *International journal of food microbiology*, 141 (1-2), 1-10.

Kiely, L. J. ve Olson, N. F., 2000, The physicochemical surface characteristics of Lactobacillus casei, *Food microbiology*, 17 (3), 277-291.

Kiruthiga, A., Padmavathy, K., Shabana, P., Naveenkumar, V., Gnanadesikan, S. ve Malaiyan, J., 2020, Improved detection of esp, hyl, asa1, gelE, cylA virulence genes among clinical isolates of Enterococci, *BMC Research Notes*, 13 (1), 1-7.

Klingberg, T. D. ve Budde, B. B., 2006, The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five potential probiotic lactobacilli consumed as freeze-dried cultures or as probiotic sausage, *International journal of food microbiology*, 109 (1-2), 157-159.

Kõll-Klais, P., Mändar, R., Leibur, E., Marcotte, H., Hammarström, L. ve Mikelsaar, M., 2005, Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity, *Oral microbiology and immunology*, 20 (6), 354-361.

Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J. ve Matošić, S., 2003, Adhesion and aggregation ability of probiotic strain Lactobacillus acidophilus M92, *Journal of Applied Microbiology*, 94 (6), 981-987.

Kreft, á., Marre, R., Schramm, U. ve Wirth, R., 1992, Aggregation substance of Enterococcus faecalis mediates adhesion to cultured renal tubular cells, *Infection and immunity*, 60 (1), 25-30.

Kumar, M., Nagpal, R., Kumar, R., Hemalatha, R., Verma, V., Kumar, A., Chakraborty, C., Singh, B., Marotta, F. ve Jain, S., 2012, Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases, *Experimental diabetes research*, 2012.

Ladero, V., Calles-Enríquez, M., Fernández, M. ve A Alvarez, M., 2010, Toxicological effects of dietary biogenic amines, *Current Nutrition & Food Science*, 6 (2), 145-156.

Laiño, J. E., Levit, R., de LeBlanc, A. d. M., de Giori, G. S. ve LeBlanc, J. G., 2019, Characterization of folate production and probiotic potential of Streptococcus gallolyticus subsp. macedonicus CRL415, *Food microbiology*, 79, 20-26.

Leavis, H., Top, J., Shankar, N., Borgen, K., Bonten, M., van Embden, J. ve Willems, R. J., 2004, A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the esp virulence gene of Enterococcus faecium and associated with epidemicity, *Journal of bacteriology*, 186 (3), 672-682.

Leclerc, H., Devriese, L. ve Mossel, D., 1996, Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of

faecal contamination in drinking water, *Journal of applied bacteriology*, 81 (5), 459-466.

Leite, A. M., Miguel, M., Peixoto, R., Ruas-Madiedo, P., Paschoalin, V., Mayo, B. ve Delgado, S., 2015, Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains, *Journal of dairy science*, 98 (6), 3622-3632.

Leuschner, R. G., Robinson, T. P., Hugas, M., Cocconcelli, P. S., Richard-Forget, F., Klein, G., Licht, T. R., Nguyen-The, C., Querol, A. ve Richardson, M., 2010, Qualified presumption of safety (QPS): a generic risk assessment approach for biological agents notified to the European Food Safety Authority (EFSA), *Trends in Food Science & Technology*, 21 (9), 425-435.

Li, B., Zhan, M., Evivie, S. E., Jin, D., Zhao, L., Chowdhury, S., Sarker, S. K., Huo, G. ve Liu, F., 2018, Evaluating the safety of potential probiotic Enterococcus durans KLDS6. 0930 using whole genome sequencing and oral toxicity study, *Frontiers in microbiology*, 9, 1943.

Li, S., Zhao, Y., Zhang, L., Zhang, X., Huang, L., Li, D., Niu, C., Yang, Z. ve Wang, Q., 2012, Antioxidant activity of Lactobacillus plantarum strains isolated from traditional Chinese fermented foods, *Food chemistry*, 135 (3), 1914-1919.

Lim, H.-J., Kim, S. Y. ve Lee, W.-K., 2004, Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use, *J Vet Sci*, 5 (4), 391-395.

Liong, M.-T., 2011, Probiotics: biology, genetics and health aspects, Springer Science & Business Media, p.

Liu, C. F., Tseng, K. C., Chiang, S. S., Lee, B. H., Hsu, W. H. ve Pan, T. M., 2011, Immunomodulatory and antioxidant potential of Lactobacillus exopolysaccharides, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91 (12), 2284-2291.

Luna, R. A. ve Foster, J. A., 2015, Gut brain axis: diet microbiota interactions and implications for modulation of anxiety and depression, *Current opinion in biotechnology*, 32, 35-41.

Maasjost, J., Lüschow, D., Kleine, A., Hafez, H. M. ve Mühldorfer, K. J. B. r. i., 2019, Presence of Virulence Genes in Enterococcus Species Isolated from Meat Turkeys in Germany Does Not Correlate with Chicken Embryo Lethality, 2019.

Maekawa, T., Fukaya, R., Takamatsu, S., Itoyama, S., Fukuoka, T., Yamada, M., Hata, T., Nagaoka, S., Kawamoto, K. ve Eguchi, H., 2018, Possible involvement of Enterococcus infection in the pathogenesis of chronic pancreatitis and cancer, *Biochemical and biophysical research communications*, 506 (4), 962-969.

Mallappa, R. H., Singh, D. K., Rokana, N., Pradhan, D., Batish, V. K. ve Grover, S., 2019, Screening and selection of probiotic Lactobacillus strains of Indian gut origin based on assessment of desired probiotic attributes combined with principal component and heatmap analysis, *LWT*, 105, 272-281.

Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. ve Tsakalidou, E., 2006, Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products, *International Dairy Journal*, 16 (3), 189-199.

Marchesi, J. R., Adams, D. H., Fava, F., Hermes, G. D., Hirschfield, G. M., Hold, G., Quraishi, M. N., Kinross, J., Smidt, H. ve Tuohy, K. M., 2016, The gut microbiota and host health: a new clinical frontier, *Gut*, 65 (2), 330-339.

Mishra, V. ve Prasad, D., 2005, Application of in vitro methods for selection of Lactobacillus casei strains as potential probiotics, *International journal of food microbiology*, 103 (1), 109-115.

Moreno, M. F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. ve De Vuyst, L., 2006, The role and application of enterococci in food and health, *International journal of food microbiology*, 106 (1), 1-24.

Morrison, D., Woodford, N. ve Cookson, B., 1997, Enterococci as emerging pathogens of humans, *Journal of Applied Microbiology*, 83 (S1), 89S-99S.

Mozzi, F., Vaningelgem, F., Hébert, E. M., Van der Meulen, R., Moreno, M. R. F., de Valdez, G. F. ve De Vuyst, L., 2006, Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers, *Applied and environmental microbiology*, 72 (6), 4431-4435.

Nakajima, H., Suzuki, Y. ve HIROTA, T., 1992, Cholesterol lowering activity of ropy fermented milk, *Journal of Food Science*, 57 (6), 1327-1329.

Nami, Y., Vaseghi Bakhshayesh, R., Mohammadzadeh Jalaly, H., Lotfi, H., Eslami, S. ve Hejazi, M. A., 2019, Probiotic properties of Enterococcus isolated from artisanal dairy products, *Frontiers in microbiology*, 10, 300.

Nguyen, T., Kang, J. ve Lee, M., 2007, Characterization of Lactobacillus plantarum PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects, *International journal of food microbiology*, 113 (3), 358-361.

Ochoa, S. A., Escalona, G., Cruz-Córdova, A., Dávila, L. B., Saldaña, Z., Cázares-Domímguez, V., Eslava, C. A., López-Martínez, B., Hernández-Castro, R. ve Aquino-Jarquin, G., 2013, Molecular analysis and distribution of multidrug-resistant Enterococcus faeciumisolates belonging to clonal complex 17 in a tertiary care center in Mexico City, *BMC microbiology*, 13 (1), 291.

Ogier, J.-C. ve Serror, P., 2008, Safety assessment of dairy microorganisms: the Enterococcus genus, *International journal of food microbiology*, 126 (3), 291-301.

Ogunremi, O., Sanni, A. ve Agrawal, R., 2015, Probiotic potentials of yeasts isolated from some cereal-based N igerian traditional fermented food products, *Journal of Applied Microbiology*, 119 (3), 797-808.

Okuklu, B., 2014, Isolation, Characterization, and Screening Probiotic Properties of Artisanal Yoghurt Starter Strains from Urla Region, Ph.D Thesis, *İzmir Institute of Technology, Food Engineering*, 151s.

Olmsted, S. B., Dunny, G. M., Erlandsen, S. L. ve Wells, C. L., 1994, A plasmid-encoded surface protein on Enterococcus faecalis augments its internalization by cultured intestinal epithelial cells, *Journal of Infectious Diseases*, 170 (6), 1549-1556.

Ooi, L.-G. ve Liong, M.-T., 2010, Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings, *International journal of molecular sciences*, 11 (6), 2499-2522.

Oral, H., 2015, Farkli Kaynaklardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bazi Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, 84s.

Ouwehand, A. C., Forssten, S., Hibberd, A. A., Lyra, A. ve Stahl, B., 2016, Probiotic approach to prevent antibiotic resistance, *Annals of Medicine*, 48 (4), 246-255.

Özlü, H., 2015, Bazı Peynirlerden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bakteriyosin Üretme Yeteneği, Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Estitüsü, Erzurum*.

Palmer, K. L., Kos, V. N. ve Gilmore, M. S., 2010, Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance, *Current opinion in microbiology*, 13 (5), 632-639.

Pereira, D. I. ve Gibson, G. R., 2002, Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut, *Applied and environmental microbiology*, 68 (9), 4689-4693.

Persichetti, E., De Michele, A., Codini, M. ve Traina, G., 2014, Antioxidative capacity of Lactobacillus fermentum LF31 evaluated in vitro by oxygen radical absorbance capacity assay, *Nutrition*, 30 (7-8), 936-938.

Pieniz, S., de Moura, T. M., Cassenego, A. P. V., Andreazza, R., Frazzon, A. P. G., de Oliveira Camargo, F. A. ve Brandelli, A., 2015, Evaluation of resistance genes and virulence factors in a food isolated Enterococcus durans with potential probiotic effect, *Food Control*, 51, 49-54.

Pieterse, R., Todorov, S. D. ve Dicks, L. M., 2010, Mode of action and in vitro susceptibility of mastitis pathogens to macedocin ST91KM and preparation of a teat seal containing the bacteriocin, *Brazilian Journal of Microbiology*, 41 (1), 133-145.

Plessas, S., Nouska, C., Karapetsas, A., Kazakos, S., Alexopoulos, A., Mantzourani, I., Chondrou, P., Fournomiti, M., Galanis, A. ve Bezirtzoglou, E., 2017, Isolation, characterization and evaluation of the probiotic potential of a novel Lactobacillus strain isolated from Feta-type cheese, *Food chemistry*, 226, 102-108.

Popović, N., Dinić, M., Tolinački, M., Mihajlović, S., Terzić-Vidojević, A., Bojić, S., Djokić, J., Golić, N. ve Veljović, K., 2018, New insight into biofilm formation ability, the presence of virulence genes and probiotic potential of Enterococcus sp. dairy isolates, *Frontiers in microbiology*, 9, 78.

Pradhan, D., Singh, R., Tyagi, A., Rashmi, H., Batish, V. ve Grover, S., 2019, Assessing safety of Lactobacillus plantarum MTCC 5690 and Lactobacillus fermentum MTCC 5689 using in vitro approaches and an in vivo murine model, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 101, 1-11.

Pradhan, D., Mallappa, R. H. ve Grover, S., 2020, Comprehensive approaches for assessing the safety of probiotic bacteria, *Food Control*, 108, 106872.

Prado, F. C., Lindner, J. D. D., Inaba, J., Thomaz-Soccol, V., Brar, S. K. ve Soccol, C. R., 2015, Development and evaluation of a fermented coconut water beverage with potential health benefits, *Journal of Functional Foods*, 12, 489-497.

Prescott, S. L. ve Björkstén, B., 2007, Probiotics for the prevention or treatment of allergic diseases, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120 (2), 255-262.

Psani, M. ve Kotzekidou, P., 2006, Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22 (12), 1329-1336.

Purutoğlu, K., 2018, Geleneksel Kefir Danelerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterileri ve Mayalarin Tanımlanması ile Bu Mikroorganizmaların Bazı Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Bayburt Üniversitesi, Fen Bilimleri Üniversitesi*, 97s.

Rajoka, M. S. R., Mehwish, H. M., Siddiq, M., Haobin, Z., Zhu, J., Yan, L., Shao, D., Xu, X. ve Shi, J., 2017, Identification, characterization, and probiotic potential of Lactobacillus rhamnosus isolated from human milk, *LWT*, 84, 271-280.

Rajoka, M. S. R., Hayat, H., Sarwar, S., Mehwish, H., Ahmad, F., Hussain, N., Shah, S., Khurshid, M., Siddiqu, M. ve Shi, J., 2018, Isolation and evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from poultry intestine, *Microbiology*, 87 (1), 116-126.

Ramadan, A. K. R., 2014, Isolation and Characterization of Some Lactic Acid Bacteria from Home-Made Dairy Products and Investigation of Some Antimicrobial and Enzymatic Properties, Master Thesis, *Kahramanmaraş Sütçü İmam University*, 73.

Ren, D., Zhu, J., Gong, S., Liu, H. ve Yu, H., 2018, Antimicrobial characteristics of lactic acid bacteria isolated from homemade fermented foods, *BioMed Research International*, 2018.

Rendueles, O., Kaplan, J. B. ve Ghigo, J. M., 2013, Antibiofilm polysaccharides, *Environmental microbiology*, 15 (2), 334-346.

Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., Girones, R., Koutsoumanis, K., Lindqvist, R., Nørrung, B. ve Robertson, L., 2017, Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 6: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2017, *EFSA Journal*, 15 (7).

Rozdzinski, E., Marre, R., Susa, M., Wirth, R. ve Muscholl-Silberhorn, A., 2001, Aggregation substance-mediated adherence of Enterococcus faecalis to immobilized extracellular matrix proteins, *Microbial pathogenesis*, 30 (4), 211-220.

Rönkä, E., Malinen, E., Saarela, M., Rinta-Koski, M., Aarnikunnas, J. ve Palva, A., 2003, Probiotic and milk technological properties of Lactobacillus brevis, *International journal of food microbiology*, 83 (1), 63-74.

Ruiz-Moyano, S., Tao, N., Underwood, M. A. ve Mills, D. A., 2012, Rapid discrimination of Bifidobacterium animalis subspecies by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, *Food microbiology*, 30 (2), 432-437.

Russo, P., López, P., Capozzi, V., De Palencia, P. F., Dueñas, M. T., Spano, G. ve Fiocco, D., 2012, Beta-glucans improve growth, viability and colonization of probiotic microorganisms, *International journal of molecular sciences*, 13 (5), 6026-6039.

Sabir, F., Beyatli, Y., Cokmus, C. ve Onal-Darilmaz, D., 2010, Assessment of potential probiotic properties of Lactobacillus spp., Lactococcus spp., and Pediococcus spp. strains isolated from kefir, *Journal of Food Science*, 75 (9), M568-M573.

Sanders, M. E., Akkermans, L. M., Haller, D., Hammerman, C., Heimbach, J. T., Hörmannsperger, G. ve Huys, G., 2010, Safety assessment of probiotics for human use, *Gut microbes*, 1 (3), 164-185.

Santos, K. M. O. d., Vieira, A. D. S., Salles, H. O., Oliveira, J. d. S., Rocha, C. R. C., Borges, M. d. F., Bruno, L. M., Franco, B. D. G. d. M. ve Todorov, S. D., 2015, Safety, beneficial and technological properties of Enterococcus faecium isolated from Brazilian cheeses, *Brazilian Journal of Microbiology*, 46 (1), 237-249.

Santos, M. S., 1996, Biogenic amines: their importance in foods, *International journal of food microbiology*, 29 (2-3), 213-231.

Sartingen, S., Rozdzinski, E., Muscholl-Silberhorn, A. ve Marre, R., 2000, Aggregation Substance Increases Adherence and Internalization, but Not Translocation, of Enterococcus faecalisthrough Different Intestinal Epithelial Cells In Vitro, *Infection and immunity*, 68 (10), 6044-6047.

Savage, D., 1992, Growth phase, cellular hydrophobicity, and adhesion in vitro of lactobacilli colonizing the keratinizing gastric epithelium in the mouse, *Applied and environmental microbiology*, 58 (6).

Shekh, S. L., Dave, J. M. ve Vyas, B. R. M., 2016, Characterization of Lactobacillus plantarum strains for functionality, safety and γ-amino butyric acid production, *LWT*, 74, 234-241.

Soccol, C., Prado, M., Garcia, L., Rodrigues, C., Medeiros, A. ve Soccol, V., 2014, Current developments in probiotics, *J. Microb. Biochem. Technol*, 7, 11-20.

Sornplang, P. ve Piyadeatsoontorn, S., 2016, Probiotic isolates from unconventional sources: a review, *Journal of animal science and technology*, 58 (1), 1-11.

Soyuçok, A., Teslime, E. ve KILIÇ, G. B., 2016, Ekzopolisakkaritlerin özellikleri ve gıda sanayindeki önemi, *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5, 332-344.

Şahin, N., 2012, Hayvan Kaynaklı *Lactobacillus* Türlerinin Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.

Tarrah, A., Castilhos, J. d., Rossi, R. C., Duarte, V. d. S., Ziegler, D. R., Corich, V. ve Giacomini, A., 2018, In vitro probiotic potential and anti-cancer activity of newly isolated folate-producing Streptococcus thermophilus strains, *Frontiers in microbiology*, 9, 2214.

Tassou, C., Panagou, E. ve Katsaboxakis, K., 2002, Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines, *Food microbiology*, 19 (6), 605-615.

ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M. L. J. ve Huis in 't Veld, J. H. J., 1990, Occurrence and formation of biologically active amines in foods, *International journal of food microbiology*, 11 (1), 73-84.

Todorov, S. D., Stojanovski, S., Iliev, I., Moncheva, P., Nero, L. A. ve Ivanova, I. V., 2017, Technology and safety assessment for lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian fermented meat product" lukanka", *Brazilian Journal of Microbiology*, 48 (3), 576-586.

Tokatlı, M., 2013, Ankara Çubuk Yöresi Turşularından İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanmaları, Teknolojik ve Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi ve Starter Olarak Kullanılma Olanaklarının Değerlendirilmesi, Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, 192s.

Tomaro-Duchesneau, C., Jones, M. L., Shah, D., Jain, P., Saha, S. ve Prakash, S., 2014, Cholesterol assimilation by Lactobacillus probiotic bacteria: an in vitro investigation, *BioMed Research International*, 2014, 1-9.

Tomita, H. ve Ike, Y., 2004, Tissue-specific adherent Enterococcus faecalis strains that show highly efficient adhesion to human bladder carcinoma T24 cells also adhere to extracellular matrix proteins, *Infection and immunity*, 72 (10), 5877-5885.

Toomey, N., Monaghan, Á., Fanning, S. ve Bolton, D., 2009, Transfer of antibiotic resistance marker genes between lactic acid bacteria in model rumen and plant environments, *Applied and environmental microbiology*, 75 (10), 3146-3152.

Trivedi, K., Cupakova, S. ve Karpiskova, R., 2011, Virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from food-stuffs, *Veterinarni Medicina*, 56 (7), 352-357.

Usman, A. H., 1999, Bile tolerance, taurocholate deconjugation, and binding of cholesterol by Lactobacillus gasseri strains, *Journal of dairy science*, 82 (2), 243-248.

Uymaz, B., 2009, Probiyotik Özellik Taşıyan Gıda ve Insan Kaynaklı Laktobasillerin Izolasynu, Tanımlanması ve Bakteriyosin Üretim Yeteneklerinin Karakterizasyonu, Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, 146.

Vankerckhoven, V., Van Autgaerden, T., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., Jabes, D. ve Goossens, H., 2004, Development of a multiplex PCR for the detection of asa1, gelE, cylA, esp, and hyl genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of Enterococcus faecium, *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (10), 4473-4479.

Veljović, K., Popović, N., Miljković, M., Tolinački, M., Terzić-Vidojević, A. ve Kojić, M., 2017, Novel aggregation promoting factor AggE contributes to the probiotic properties of Enterococcus faecium BGGO9-28, *Frontiers in microbiology*, 8 (1843), 1-14.

Verón, H. E., Di Risio, H. D., Isla, M. I. ve Torres, S., 2017, Isolation and selection of potential probiotic lactic acid bacteria from Opuntia ficus-indica fruits that grow in Northwest Argentina, *LWT*, 84, 231-240.

Vidhyasagar, V. ve Jeevaratnam, K., 2013, Evaluation of Pediococcus pentosaceus strains isolated from Idly batter for probiotic properties in vitro, *Journal of Functional Foods*, 5 (1), 235-243.

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

Werner, G., Coque, T., Hammerum, A., Hope, R., Hryniewicz, W., Johnson, A., Klare, I., Kristinsson, K., Leclercq, R. ve Lester, C., 2008, Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe, *Eurosurveillance*, 13 (47), 19046.

Wessels, D., Jooste, P. ve Mostert, J., 1990, Technologically important characteristics of Enterococcus isolates from milk and dairy products, *Int. J. Food Microbiol*, 10 (3-4), 349-352.

Williams, N. T., 2010, Probiotics, *American Journal of Health-System Pharmacy*, 67 (6), 449-458.

Yan, F. ve Polk, D., 2011, Probiotics and immune health. Curr. Opin. Gastroenterol.

Yıldız, K. D., 2013, Balıkesir Yöresine Ait Peynirlerden İzole Edilen *Lactobacillus* Bakterilerinin Starter ve Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi*.

Zago, M., Fornasari, M. E., Carminati, D., Burns, P., Suàrez, V., Vinderola, G., Reinheimer, J. ve Giraffa, G., 2011, Characterization and probiotic potential of

Lactobacillus plantarum strains isolated from cheeses, *Food microbiology*, 28 (5), 1033-1040.

Zárate, G. ve Chaia, A. P., 2012, Influence of lactose and lactate on growth and β-galactosidase activity of potential probiotic Propionibacterium acidipropionici, *Anaerobe*, 18 (1), 25-30.

Zavaglia, A. G., Kociubinski, G., Perez, P. ve DE ANTONI, G., 1998, Isolation and characterization of Bifidobacterium strains for probiotic formulation, *Journal of Food Protection*, 61 (7), 865-873.

Zhao, G. ve Zhang, G., 2005, Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying, *Journal of Applied Microbiology*, 99 (2), 333-338.

Zommiti, M., Cambronel, M., Maillot, O., Barreau, M., Sebei, K., Feuilloley, M., Ferchichi, M. ve Connil, N., 2018, Evaluation of probiotic properties and safety of Enterococcus faecium isolated from artisanal Tunisian meat "Dried Ossban", *Frontiers in microbiology*, 9 (1685), 1-12.

Zoumpopoulou, G., Pot, B., Tsakalidou, E. ve Papadimitriou, K., 2017, Dairy probiotics: Beyond the role of promoting gut and immune health, *International Dairy Journal*, 67, 46-60.

Zoumpopoulou, G., Tzouvanou, A., Mavrogonatou, E., Alexandraki, V., Georgalaki, M., Anastasiou, R., Papadelli, M., Manolopoulou, E., Kazou, M. ve Kletsas, D., 2018, Probiotic features of lactic acid bacteria isolated from a diverse pool of traditional Greek dairy products regarding specific strain-host interactions, *Probiotics and antimicrobial proteins*, 10 (2), 313-322.

EKLER

EK-1: Varyans Analiz Sonuçları

Tablo 1: *Lactobacillus* spp. izolatlarının dondurma ve liyofilizasyon işlemlerine dayanıklılık sonuçlarına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Dondurma Öncesi			Dondurma Sonrası			Liyofilizasyon Sonrası		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
***Lactobacillus* spp.**	10	0.1161	17.58**	10	0.0997	10.50**	10	0.0173	1.72ns
Hata	11	0.0066		11	0.0095		11	0.0101	
Toplam	21			21			21		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 2: *Enterococcus* spp. izolatlarının dondurma ve liyofilizasyon işlemlerine dayanıklılık sonuçlarına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Dondurma Öncesi			Dondurma Sonrası			Liyofilizasyon Sonrası		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
***Enterococcus* spp.**	9	0.0539	8.21**	9	0.1255	16.09**	9	0.1520	15.48**
Hata	10	0.0066		10	0.0078		10	0.0098	
Toplam	19			19			19		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 3: *Streptococcus* spp. izolatlarının dondurma ve liyofilizasyon işlemlerine dayanıklılık sonuçlarına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Dondurma Öncesi			Dondurma Sonrası			Liyofilizasyon Sonrası		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
***Streptococcus* spp.**	7	0.1284	84.55**	7	0.1765	372.52**	7	0.1995	36.64**
Hata	8	0.0015		8	0.0005		8	0.0054	
Toplam	15			15			15		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 4: *Lactobacillus* spp. izolatlarının lizozim toleransına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	0. dakika			30. dakika			120. dakika		
	SD	**KO**	**F Değeri**	**SD**	**KO**	**F Değeri**	**SD**	**KO**	**F Değeri**
***Lactobacillus* spp.**	10	0.1194	2.27ns	10	1.5255	24.42**	10	2.1215	47.23**
Hata	11	0.0525		11	0.0625		11	0.0449	
Toplam	21			21			21		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 5: *Enterococcus* spp. izolatlarının lizozim toleransına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	0. dakika			30. dakika			120. dakika		
	SD	**KO**	**F Değeri**	**SD**	**KO**	**F Değeri**	**SD**	**KO**	**F Değeri**
***Enterococcus* spp.**	9	0.0801	1.35ns	9	0.6495	11.22**	9	0.7402	9.76**
Hata	10	0.0594		10	0.0579		10	0.0759	
Toplam	19			19			19		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 6: *Streptococcus* spp. izolatlarının lizozim toleransına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	0. dakika			30. dakika			120. dakika		
	SD	**KO**	**F Değeri**	**SD**	**KO**	**F Değeri**	**SD**	**KO**	**F Değeri**
***Streptococcus* spp.**	7	0.5080	10.98**	7	0.3965	17.94**	7	0.7606	10.35**
Hata	8	0.0463		8	0.0221		8	0.0735	
Toplam	15			15			15		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 7: 665, 1030 ve 1270 no'lu *Lactobacillus* izolatlarının farklı inkübasyon sürelerinin lizozim toleransları üzerine etkisine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	665			1030			1270		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
İnkübasyon süresi	2	1.4858	56.33**	2	2.7129	84.22**	2	0.3120	5.42ns
Hata	3	0.0264		3	0.0322		3	0.0576	
Toplam	5			5			5		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 8: 16, 184, 15 ve 449 no'lu *Lactobacillus* izolatlarının farklı inkübasyon sürelerinin lizozim toleransları üzerine etkisine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	16			184			15			449		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
İnkübasyon süresi	2	4.5310	435.70**	2	5.1343	184.76**	2	2.205	12.36*	2	3.8261	82.76**
Hata	3	0.0104		3	0.0278		3	0.178		3	0.0462	
Toplam	5			5			5			5		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 9: 24, 480, 675 ve 288 no'lu *Lactobacillus* izolatlarının farklı inkübasyon sürelerinin lizozim toleransları üzerine etkisine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	24			480			675			288		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
İnkübasyon süresi	2	5.1311	241.80**	2	2.654	15.88*	2	5.4674	2211.41**	2	0.1387	8.35ns
Hata	3	0.0212		3	0.167		3	0.0025		3	0.0166	
Toplam	5			5			5			5		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 10: 99, 12 ve 277 no'lu *Enterococcus* izolatlarının farklı inkübasyon sürelerinin lizozim toleransları üzerine etkisine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	99			12			277		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
İnkübasyon süresi	2	1.2801	194.44**	2	2.4007	37.22**	2	1.3465	15.01*
Hata	3	0.0066		3	0.0645		3	0.0897	
Toplam	5			5			5		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 11: 894, 702 ve 382 no'lu *Enterococcus* izolatlarının farklı inkübasyon sürelerinin lizozim toleransları üzerine etkisine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	894			702			382		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
İnkübasyon süresi	2	1.070	8.46ns	2	1.7245	83.58**	2	2.0561	139.55**
Hata	3	0.127		3	0.0206		3	0.0147	
Toplam	5			5			5		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 12: 1041, 394, 1078 ve 1050 no'lu *Enterococcus* izolatlarının farklı inkübasyon sürelerinin lizozim toleransları üzerine etkisine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	1041			394			1078			1050		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
İnkübasyon süresi	2	5.2426	436.27**	2	1.2984	127.50**	2	0.6733	7.51ns	2	3.479	16.63*
Hata	3	0.0120		3	0.0102		3	0.0896		3	0.209	
Toplam	5			5			5			5		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 13: 1046, 930, 120 ve 932 no'lu *Streptococcus* izolatlarının farklı inkübasyon sürelerinin lizozim toleransları üzerine etkisine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	1046			932			120			930		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
İnkübasyon süresi	2	0.4270	1190*	2	0.3077	8.78ns	2	0.1801	3.14ns	2	0.1667	8.77ns
Hata	3	0.0359		3	0.0350		3	0.0574		3	0.0190	
Toplam	5			5			5			5		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 14: 937, 1191, 375 ve 1214 no'lu *Streptococcus* izolatlarının farklı inkübasyon sürelerinin lizozim toleransları üzerine etkisine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	937			1191			375			1214		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
İnkübasyon süresi	2	0.3699	5.83ns	2	0.720	6.38ns	2	0.5843	26.01*	2	0.8823	27.50*
Hata	3	0.0634		3	0.113		3	0.0225		3	0.0321	
Toplam	5			5			5			5		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 15: *Lactobacillus* spp. izolatlarının safra toleransına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	% 0.06			% 0.125			% 0.25		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
***Lactobacillus* spp.**	10	72.28	20.94**	10	140.34	15.30**	10	129.5	10.99**
Hata	11	3.45		11	9.17		11	11.8	
Toplam	21			21			21		
Varyasyon Kaynağı	**% 0.5**			**% 1**					
	SD	**KO**	**F Değeri**	**SD**	**KO**	**F Değeri**			
***Lactobacillus* spp.**	10	69.3	4.82**	10	110.61	11.08**			
Hata	11	14.4		11	9.98				
Toplam	21			21					

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 16: *Enterococcus* spp. izolatlarının safra toleransına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	% 0.06			% 0.125			% 0.25		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
***Enterococcus* spp.**	9	14.85	3.98*	9	53.46	23.10**	9	75.47	9.99**
Hata	10	3.73		10	2.31		10	7.55	
Toplam	19			19			19		
Varyasyon Kaynağı	**% 0.5**			**% 1**					
	SD	**KO**	**F Değeri**	**SD**	**KO**	**F Değeri**			
***Enterococcus* spp.**	9	62.47	20.21**	9	71.53	11.06**			
Hata	10	3.09		10	6.47				
Toplam	19			19					

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 17: *Streptococcus* spp. izolatlarının safra toleransına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	% 0.06			% 0.125			% 0.25		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
***Streptococcus* spp.**	7	11.56	3.13ns	7	57.22	13.08**	7	53.81	6.43**
Hata	8	3.69		8	4.37		8	8.37	
Toplam	15			15			15		
Varyasyon Kaynağı	**% 0.5**			**% 1**					
	SD	**KO**	**F Değeri**	**SD**	**KO**	**F Değeri**			
***Streptococcus* spp.**	7	58.3	5.80*	7	105.47	26.83**			
Hata	8	10.0		8	3.93				
Toplam	15			15					

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 18: Farklı safra konsantrasyonunun 665, 1030 ve 1270 no'lu *Lactobacillus* spp. izolatlarının safra toleransları üzerine etkisine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	665			1030			1270		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
Safra Oranı	4	287.89	54.16**	4	270.59	68.01**	4	108.88	48.50**
Hata	5	5.32		5	3.05		5	2.25	
Toplam	9			9			9		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 19: Farklı safra konsantrasyonunun 16, 184, 15 ve 449 no'lu *Lactobacillus* spp. izolatlarının safra toleransları üzerine etkisine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	16			184			15			449		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
Safra Oranı	4	399.5	17.92**	4	260.1	11.73**	4	195.4	11.86**	4	441.18	54.88**
Hata	5	22.3		5	22.1		5	16.5		5	8.04	
Toplam	9			9			9			9		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 20: Farklı safra konsantrasyonunun 24, 480, 675 ve 288 no'lu *Lactobacillus* spp. izolatlarının safra toleransları üzerine etkisine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	24			480			675			288		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
Safra Oranı	4	244.84	1115.70**	4	252.71	73.05**	4	456.68	465.51**	4	190.7	8.28*
Hata	5	0.219		5	3.46		5	0.981		5	23.0	
Toplam	9			9			9			9		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 21: Farklı safra konsantrasyonunun 99, 12 ve 277 no'lu *Enterococcus* spp. izolatlarının safra toleransları üzerine etkisine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	99			12			277		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
Safra Oranı	4	18.485	39.88**	4	59.01	19.18**	4	36.07	20.31**
Hata	5	0.464		5	3.08		5	1.78	
Toplam	9			9			9		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 22: Farklı safra konsantrasyonunun 894, 702 ve 382 no'lu *Enterococcus* spp. izolatlarının safra toleransları üzerine etkisine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	894			702			382		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
Safra Oranı	4	21.703	25.75**	4	91.9	6.83*	4	35.65	5.81*
Hata	5	0.843		5	13.4		5	6.14	
Toplam	9			9			9		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 23: Farklı safra konsantrasyonunun 1041, 394, 1078 ve 1050 no'lu *Enterococcus* spp. izolatlarının safra toleransları üzerine etkisine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	1041			394			1078			1050		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
Safra Oranı	4	140.56	18.48**	4	84.96	19.55**	4	102.96	19.97**	4	156.31	45.24**
Hata	5	7.61		5	4.35		5	5.16		5	3.46	
Toplam	9			9			9			9		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 24: Farklı safra konsantrasyonunun 1046, 932, 120 ve 930 no'lu *Streptococcus* spp. izolatlarının safra toleransları üzerine etkisine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	1046			932			120			930		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
Safra Oranı	4	172.23	80.39**	4	266.0	21.65**	4	113.62	53.33**	4	124.24	46.02**
Hata	5	2.14		5	12.3		5	2.13		5	2.70	
Toplam	9			9			9			9		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 25: Farklı safra konsantrasyonunun 937, 1191, 375 ve 1214 no'lu *Streptococcus* spp. izolatlarının safra toleransları üzerine etkisine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	937			1191			375			1214		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
Safra Oranı	4	75.6	6.19*	4	26.35	5.32*	4	186.33	45.44**	4	73.75	9.08*
Hata	5	12.2		5	4.96		5	4.10		5	8.13	
Toplam	9			9			9			9		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 26: *Lactobacillus* spp. izolatlarının asit toleransına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	pH 2						pH 3					
	0. s			2. s			0. s			2. s		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
***Lactobacillus* spp.**	10	0.0788	4.24*	10	14.515	146.38**	10	0.0766	2.71ns	10	0.3726	4.52*
Hata	11	0.0186		11	0.0992		11	0.0283		11	0.0824	
Toplam	21			21			21			21		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 27: *Enterococcus* spp. izolatlarının asit toleransına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	pH 2						pH 3					
	0. s			2. s			0. s			2. s		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
***Enterococcus* spp.**	9	10.790	7063.74**	9	0.0	-	9	9.5922	190.25**	9	10.812	83590.38**
Hata	10	0.0015		10	0.0		10	0.0504		10	0.0001	
Toplam	19			19			19			19		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 28: *Streptococcus* spp. izolatlarının asit toleransına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	pH 2						pH 3					
	0. s			2. s			0. s			2. s		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
***Streptococcus* spp.**	7	3.4488	472.41**	7	0.0	-	7	0.3828	25.54**	7	12.721	1836.56**
Hata	8	0.0073		8	0.0		8	0.0150		8	0.0069	
Toplam	15			15			15			15		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 29: *Lactobacillus* spp. izolatlarının gastrik ve pankreatik özsuya toleransına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Gastrik Özsuya Tolerans						Pankreatik Özsuya Tolerans					
	0. s			3. s			0. s			24. s		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
***Lactobacillus* spp.**	10	0.1548	31.16**	10	4.4023	392.26**	10	0.0229	42.70**	10	0.1405	2.30ns
Hata	11	0.0547		11	0.0112		11	0.0005		11	0.0610	
Toplam	21			21			21			21		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 30: *Enterococcus* spp. izolatlarının gastrik ve pankreatik özsuya toleransına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Gastrik Özsuya Tolerans						Pankreatik Özsuya Tolerans					
	0. s			3. s			0. s			24. s		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
***Enterococcus* spp.**	9	0.0259	10.89**	9	1.1070	68.31**	9	0.1119	294.58**	9	0.1499	122.38**
Hata	10	0.0024		10	0.0162		10	0.0004		10	0.0012	
Toplam	19			19			19			19		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 31: *Streptococcus* spp. izolatlarının gastrik ve pankreatik özsuya toleransına ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Gastrik Özsuya Tolerans						Pankreatik Özsuya Tolerans					
	0. s			3. s			0. s			24. s		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
***Streptococcus* spp.**	7	0.1888	87.57**	7	1.3644	121.75**	7	0.1728	5.12*	7	0.1595	274.36**
Hata	8	0.0022		8	0.0112		8	0.0338		8	0.0006	
Toplam	15			15			15			15		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 32: *Lactobacillus* spp. izolatlarının adezyon kabiliyetine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Hidrofobisite						Oto-agregasyon					
	n-hekzadekan			ksilen			3. s			24. s		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
***Lactobacillus* spp.**	10	1730.8	418.14**	10	2371.0	26.84**	10	76.9	1.51ns	10	57.9	0.82ns
Hata	11	4.14		11	88.3		11	50.8		11	70.4	
Toplam	21			21			21			21		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 33: *Enterococcus* spp. izolatlarının adezyon kabiliyetine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Hidrofobisite						Oto-agregasyon					
	n-hekzadekan			ksilen			3. s			24. s		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
***Enterococcus* spp.**	9	1077.8	248.55**	9	1652.2	23.72**	9	120.4	1.59ns	9	442.6	4.97*
Hata	10	4.34		10	69.7		10	75.7		10	89.0	
Toplam	19			19			19			19		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 34: *Streptococcus* spp. izolatlarının adezyon kabiliyetine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Hidrofobisite						Oto-agregasyon					
	n-hekzadekan			ksilen			3. s			24. s		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
***Streptococcus* spp.**	7	990.2	11.22**	7	1787.3	34.20**	7	31.9	0.72ns	7	280.3	8.09**
Hata	8	88.2		8	52.3		8	44.6		8	34.6	
Toplam	15			15			15			15		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 35: *Lactobacillus* spp. izolatlarının antibakteriyal aktivitelerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	*L. monocytogenes* ATCC 7644			*Staph. aureus* ATCC 25923		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
***Lactobacillus* spp.**	10	34.609	152.28**	10	63.245	107.03**
Hata	11	0.227		11	0.591	
Toplam	21			21		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 36: *Enterococcus* spp. izolatlarının antibakteriyal aktivitelerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	*L. monocytogenes* ATCC 7644			*Staph. aureus* ATCC 25923		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
***Enterococcus* spp.**	9	69.272	461.81**	9	14.383	19.18**
Hata	10	0.150		10	0.750	
Toplam	19			19		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 37: *Streptococcus* spp. izolatlarının antibakteriyal aktivitelerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	*L. monocytogenes* ATCC 7644			*Staph. aureus* ATCC 25923			*B. cereus* ATCC 11778		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
***Streptococcus* spp.**	7	67.134	214.83**	7	55.857	111.71**	7	52.429	209.71**
Hata	8	0.313		8	0.500		8	0.250	
Toplam	15			15			15		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 38: *Lactobacillus* spp. izolatlarının β-galaktosidaz aktivitesi, kolesterol asimilasyonu ve EPS üretimlerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	β-galaktosidaz Aktivitesi			Kolesterol Asimilasyonu			EPS Üretimi		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
***Lactobacillus* spp.**	10	11146.4	166.93**	10	333.76	63.70**	10	14206	4.39*
Hata	11	66.8		11	5.24		11	3234	
Toplam	21			21			21		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 39: *Enterococcus* spp. izolatlarının β-galaktosidaz aktivitesi, kolesterol asimilasyonu ve EPS üretimlerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	β-galaktosidaz Aktivitesi			Kolesterol Asimilasyonu			EPS Üretimi		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
***Enterococcus* spp.**	9	18.0159	976.77**	9	523.68	68.97**	9	15602	4.06*
Hata	10	0.0184		10	7.45		10	3845	
Toplam	19			19			19		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.

Tablo 40: *Streptococcus* spp. izolatlarının β-galaktosidaz aktivitesi, kolesterol asimilasyonu ve EPS üretimlerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	β-galaktosidaz Aktivitesi			Kolesterol Asimilasyonu			EPS Üretimi		
	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri	SD	KO	F Değeri
***Streptococcus* spp.**	7	439.157	444.97**	7	162.88	59.99**	7	2178	2.30ns
Hata	8	0.987		8	2.72		8	945	
Toplam	15			15			15		

**p<0.01, *p<0.05, ns önemsiz.