

T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
ANABİLİM DALI

GENETİK OLARAK KARAKTERİZE EDİLEN İNSAN KAYNAKLI *LACTOBACILLUS GASSERI* SUŞLARININ PROBİYOTİK KÜLTÜR OLARAK KULLANIM POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşe GÜNYAKTI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Meltem AŞAN ÖZÜSAĞLAM

AKSARAY, 2017

T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
ANABİLİM DALI

GENETİK OLARAK KARAKTERİZE EDİLEN İNSAN KAYNAKLI *LACTOBACILLUS GASSERI* SUŞLARININ PROBİYOTİK KÜLTÜR OLARAK KULLANIM POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşe GÜNYAKTI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Meltem AŞAN ÖZÜSAĞLAM

AKSARAY, 2017

AKSARAY ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KABUL BELGESİ

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 142330310 numaralı Tezli Yüksek Lisans öğrencisi, "AYŞE GÜNYAKTI", ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "GENETİK OLARAK KARAKTERİZE EDİLEN İNSAN KAYNAKLI *LACTOBACILLUS GASSERI* SUŞLARININ PROBİYOTİK KÜLTÜR OLARAK KULLANIM POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ" başlıklı tezini, aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı :	**Doç. Dr. Meltem AŞAN ÖZÜSAĞLAM** **Aksaray Üniversitesi**	**.....**
Jüri Üyeleri :	**Prof. Dr. Fatih ALGI** **Aksaray Üniversitesi**	**.....**
Jüri Üyeleri :	**Doç. Dr. Songül BUDAK DİLER** **Ömer Halis Demir Üniversitesi**	**.....**

Teslim Tarihi: 09 Mayıs 2017

Savunma Tarihi: 24 Mayıs 2017

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ve bu eserleri her kullanışımda alıntı yaparak yararlandığımı belirtir; bunu şerefimle doğrularım. Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Ayşe GÜNYAKTI

ÖNSÖZ

Laktik asit bakterileri çeşitli proseslerde kullanılmak üzere probiyotik kültür olarak en çok yararlanılan, genel olarak güvenli ve konakçı sağlığı üzerinde terapötik etkileri bulunan bakteri grupları olarak değerlendirilmektedir**.** Daha önce yapılan çalışmalarda çeşitli kaynaklardan izole edilmiş *Lactobacillus* sp. suşlarının probiyotik kültür olma potansiyelleri araştırılmış ve bu suşların gıda, farmasötik, enzim teknolojileri, biyoteknolojik uygulama alanlarında kullanım potansiyelleri değerlendirilmiştir. Ancak anne sütü orjinli *Lactobacillus gasseri* suşlarından probiyotik kültür olarak yararlanım potansiyeli ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. Probiyotik kültürlerin küresel pazarlardaki payı gün geçtikçe büyümekte ve probiyotik özellik taşıyan yeni suşların arayışı ve karakterizasyon çalışmaları devam etmektedir.

Bu çalışmada anne sütünden izole edilip, tür ve cins bazında moleküler olarak identifikasyonu yapılan altı adet *L. gasseri MA* suşunun probiyotik kültür olarak kullanım potansiyelleri araştırılmıştır. Bu bağlamda suşların probiyotik kültür olarak değerlendirilmesi için gerekli olan düşük pH, safra, pepsin, pankreatin, antibiyotik direnç özellikleri ve hemolitik aktiviteleri gibi çeşitli seçim kriterleri in vitro koşullarda araştırılmıştır. Bunun yanı sıra suşların sanayilerin çeşitli uygulama alanlarında kullanım potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla, yaygın insan-gıda patojenleri, *Candida* sp. türleri, balık patojenleri üzerinde antimikrobiyal aktiviteleri, agregasyon özellikleri, antioksidan aktiviteleri, sodyum benzoat direnç özellikleri ve alfa amilaz enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Çalışma verilerine göre özellikle *L. gasseri* MA-1, MA-2, MA-3, MA-5 ve MA-6 suşlarının sanayinin çeşitli alanlarında probiyotik kültür olarak kullanım potansiyeli taşıdıkları belirlenmiştir. MA-4 suşunun alfa hemolitik aktiviteye göstermesi nedeniyle probiyotik kültür olarak kullanımı önerilmemektedir. Ancak suşun alfa amilaz aktivitesine sahip olması nedeniyle enzim teknolojisinde kullanımı önerilebilir.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde ve tez çalışmamın her aşamasında değerli bilgilerini ve görüşlerini esirgemeyen Danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Meltem AŞAN ÖZÜSAĞLAM'a desteklerinden dolayı en içten duygular ile saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Laktik asit bakterilerinin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi aşamasında kıymetli bilgilerini ve desteğini benden esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Yavuz Selim ÇAKMAK hocama teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim sürecimin her aşamasında beni motive eden, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve üzerimde çok büyük emekleri olan canım aileme (dedem, annem, babam ve kardeşim Handan GÜNYAKTI) teşekkürlerimi borç bilirim.

Tez çalışmam sırasında yardımlarını, desteğini ve dostluğunu esirgemeyen arkadaşım Muhammad MUJTABA'ya teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

DOĞRULUK BEYANI ..... **iv**
ÖNSÖZ ..... **v**
TEŞEKKÜR ..... **vi**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
ÖZET ..... **ix**
ABSTRACT ..... **x**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xi**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xii**
SİMGELER DİZİNİ ..... **xiii**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xiv**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **4**
2.1 Anne Sütünün Genel Özellikleri ve Mikrobiyal İçeriği 4
2.2 Gastrointestinal Sistem Mikrobiyotası 7
2.3 Probiyotik Mikroorganizmalar 9
2.4 Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri 11
2.5 *Lactobacillus gasseri* 14
3. MALZEME VE YÖNTEM **16**
3.1 Laktik Asit Bakteri Suşları 16
3.2 MA Suşlarının Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi 16
3.2.1 MA Suşlarının Antibiyotik Hassasiyetinin Belirlenmesi 16
3.2.2 MA Suşlarının Düşük PH Toleransının Belirlenmesi 17
3.2.3 MA Suşlarının Safra Toleranslarının Belirlenmesi 17
3.2.4 MA Suşlarının Pepsin Toleranslarının Belirlenmesi 18
3.2.5 MA Suşlarının Pankreatin Toleranslarının Belirlenmesi 18
3.2.6 MA Suşlarının Hemolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi 19
3.3 MA Suşlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi 19
3.3.1 Test Mikroorganizmalarının Hazırlanması 19
3.3.2 *L. gasseri* MA Kültürlerinin Hazırlanması 20
3.3.3 Metodun Uygulanması 20
3.4 MA Suşlarının Agregasyon Özelliklerinin Belirlenmesi 21
3.4.1 Otoagregasyon Özelliklerinin Belirlenmesi 21
3.4.2 Ko-agregasyon Özelliklerinin Belirlenmesi 21
3.5 Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi 22
3.5.1 Laktik Asit Bateri Kültürlerinin Hazırlanması 23
3.5.2 DPPH Radikali Süpürme Özelliklerinin Belirlenmesi 23
3.5.3 Demir İyonu Şelatlama Aktivitelerinin Belirlenmesi 24
3.6 Alfa Amilaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi 24
3.7 Sodyum Benzoat Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi 25
4. BULGULAR VE TARTIŞMA **26**
4.1 MA suşlarının Bazı Probiyotik Özellikleri 26
4.1.1 Antibiyotik Hassasiyeti 26
4.1.2 Düşük pH Toleransı 30
4.1.3 Safra Suyu Toleransı 34

Sayfa

4.1.4 Pepsin Toleransı 37
4.1.5 Pankreatin Toleransı 39
4.1.6 Hemolitik Aktivite 41
4.2 MA suşlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri 44
4.3 MA suşlarının Agregasyon Özellikleri 49
4.3.1 Otoagregasyon Özellikleri 49
4.3.2 Ko-agregasyon Özellikleri 51
4.4 MA suşlarının Antioksidan Aktiviteleri 54
4.5 MA suşlarının Alfa Amilaz Enzim Aktiviteleri 56
4.6 MA suşlarının Sodyum Benzoat Direnç Özellikleri 58
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 62
KAYNAKLAR 68
EKLER 77
ÖZGEÇMİŞ 105

ÖZET

GENETİK OLARAK KARAKTERİZE EDİLEN İNSAN KAYNAKLI *LACTOBACILLUS GASSERI* SUŞLARININ PROBİYOTİK KÜLTÜR OLARAK KULLANIM POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

Çalışmada, daha önceden anne sütünden izole edilen altı adet *Lactobacillus gasseri* MA suşunun, PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tabanlı moleküler identifikasyon yöntemi ile genetik olarak tanımlanmıştır. MA suşların probiyotik kültür olarak kullanım potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla düşük pH (2 ve 3) değerlerine, farklı (% 0.3 ve % 1) safra konsantrasyonlarına, yapay mide ve bağırsak sıvılarına karşı direnç özellikleri ve hemolitik aktiviteleri in-vitro koşullarda belirlenmiştir. Bunun yanısıra suşlardan çeşitli proseslerde yararlanım potansiyelinin tespit edilmesi amacıyla Sodyum benzoat direnç özellikleri ve alfa amilaz enzim aktiviteleri belirlenmiştir. MA suşlarının oto-agregasyon yeteneklerinin % 97-93, test mikroorganizmaları ile göstermiş oldukları koagregasyon yeteneklerinin ise % 36-58 değerler arasında dağılım göstermekte olduğu belirlenmiştir. MA suşlarının tamamının Amikasin, Gentamisin, Kanamisin, Nalidiksik Asit, Ofloksasin antibiyotiklerine karşı direnç, Amoksisilin, Ampisilin, Kloksasilin, Eritromisin, Penisilin G antibiyotiklerine karşı ise hassasiyet gösterdikleri tespit edilmiştir. MA suşlarının test mikroorganizmaları olarak kullanılan çeşitli grup patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi çalışmalarında kaydedilen inhibisyon zon çapı değerleri, on beş adet insan-gıda patojeni için 1.87-14.29 mm, yedi adet balık patojeni için 1.66-11.22 mm, iki adet Candida türü için ise 2.78-4.80 mm değer aralığında olduğu belirlenmiştir. Kaydedilen en yüksek inhibisyon zon değerlerinin MA-2 suşu için *Staphylococcus epidermidis* ATCC 11228 insan-gıda patojenine, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 11228 balık patojenine, *Candida albicans* ATCC 10231 fungusuna karşı olduğu belirlenmiştir. MA suşlarının antioksidan aktiviteleri DPPH metoduna göre % 33.33-54.93 değerleri arasında, demir iyonu şelatlama aktiviteleri ise % 7.73-26.88 değer aralığında olduğu belirlenmiştir. Tüm MA suşlarının arasında en yüksek antioksidan aktivite her iki metot için ortak bir sonuç olarak MA-5 suşu için kaydedilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Anne sütü, probiyotik, alfa amilaz, antimikrobiyal, antioksidan.

ABSTRACT

DETERMINATION OF POTENTIAL USE AS PROBIOTIC CULTURE OF GENETICALLY CHARACTERIZED HUMAN *LACTOBACILLUS GASSERI* STRAINS

In this study, six *Lactobacillus gasseri* MA strains previously isolated from the human breast milk were genetically identified by PCR (Polymerase Chain Reaction) based molecular identification method. The potency of MA strains as probiotic cultures was determined in in-vitro conditions using different parameters such as; resistance to low pH (2 and 3) values and different (0.3 and 1 %) bile concentrations, resistance to simulated gastric and intestinal fluids and hemolytic activities. Additionally, to check the potential of these strains for utilization in various processes sodium benzoate resistance properties and Alfa amylase enzyme activities have been determined. The auto-aggregation abilities of MA strains was recorded as 97-93 % while the coaggregation abilities with the test microorganisms varies between 36 % and 58 %. All the MA strains were found to be resistant against Amicacin, Gentamicin, Kanamicin, Nalidixic Acid and were found susceptible to antibiotics such as Ofloxacin, Amoxicillin, Ampicillin, Cloxacillin, Erythromycin and Penicillin. The antimicrobial activities studies of MA strains (used as test microorganisms) against various pathogenic microorganisms revealed inhibition zones values as; 1.87-14.29 mm for fifteen human-food pathogens, 1.66-11.22 mm for seven fish pathogens, and for two Candida strains 2.78-4.80 mm. For MA-2 strain the highest inhibition zones were recorded against *Staphylococcus epidermidis* ATCC 11228 human-food pathogen, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 11228 fish pathogen, *Candida albicans* ATCC 10231 fungus. According to the DPPH method the antioxidant activities of MA strains were determined to be between 33.33 % and 54.93 % and the iron ion chelating activities ranged from 7.73 % to 26.88 %. The highest antioxidant activity among all MA strains was recorded for the MA-5 strain as a common result for both methods.

Keywords: Human breast milk, probiotic, alfa amylase, antimicrobial, antioxidant.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1: Probiyotik mikroorganizmaların etki mekanizması 10
Şekil 4.1: MA-1 Suşunun bazı klinik antibiyotiklere direnç profili 27
Şekil 4.2: MA-2 Suşunun bazı klinik antibiyotiklere direnç profili 28
Şekil 4.3: MA-3 Suşunun bazı klinik antibiyotiklere direnç profili 28
Şekil 4.4: MA-4 Suşunun bazı klinik antibiyotiklere direnç profili 29
Şekil 4.5: MA-5 Suşunun bazı klinik antibiyotiklere direnç profili 29
Şekil 4.6: MA-6 Suşunun bazı klinik antibiyotiklere direnç profili 30
Şekil 4.7: MA suşlarının pH duyarlılıkları (spektrofotometrik) 32
Şekil 4.8: MA suşlarının pH duyarlılıkları (Log CFU) 33
Şekil 4.9: MA suşlarının safra duyarlılıkları (spektrofotometrik) 36
Şekil 4.10: MA suşlarının safra duyarlılıkları (Log CFU) 37
Şekil 4.11: MA suşlarının pepsin duyarlılıkları (Log CFU) 39
Şekil 4.12: MA suşlarının pankreatin duyarlılıkları (Log CFU) 41
Şekil 4.13: Kontrol grubunun hemolitik aktiviteleri 42
Şekil 4.14: MA-1, MA-2, MA-3 suşlarının hemolitik aktiviteleri 43
Şekil 4.15: MA-4, MA-5, MA-6 suşlarının hemolitik aktiviteleri 43
Şekil 4.16: MA suşlarının antimikrobiyal aktiviteleri 48
Şekil 4.17: MA suşlarının antimikrobiyal aktiviteleri 48
Şekil 4.18: MA suşlarının otoagregasyon özellikleri 50
Şekil 4.19: MA suşlarının otoagregasyon özellikleri 50
Şekil 4.20: MA suşlarının koagregasyon özellikleri 52
Şekil 4.21: MA suşlarının koagregasyon özellikleri 53
Şekil 4.22: MA suşlarının koagregasyon özellikleri 53
Şekil 4.23: MA suşlarının antioksidan aktiviteleri 56
Şekil 4.24: MA suş supernatantlarının (20µl) α-amilaz enzim aktivitesinin gözlemlenmesi 58
Şekil 4.25: MA suş süpernatantlarının (50µl) α-amilaz enzim aktivitesinin gözlemlenmesi 58

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1: Anne sütünden izole edilen mikroorganizmalar.....6
Çizelge 2.2: Klinik antibiyotikler ve etki mekanizmaları.....12
Çizelge 4.1: *L. gasseri* MA suşlarının antibiyotik hassasiyetleri 27
Çizelge 4.2: *L. gasseri* MA suşlarının antimikrobiyal aktiviteleri 46
Çizelge 4.3: *L. gasseri* MA suşlarının % otoagregasyon değerleri 49
Çizelge 4.4: *L. gasseri* MA suşlarının % koagregasyon değerleri 52
Çizelge 4.5: *L. gasseri* MA suşlarının antioksidan aktiviteleri 55
Çizelge 4.6: MA Suşlarının sodyum benzoat direnç özellikleri 60
Çizelge 4.7: MA Suşlarının sodyum benzoat direnç özellikleri.....61
Çizelge 4.8: MA Suşlarının sodyum benzoatlı ortamda asit üretme yetenekleri.....61

SİMGELER DİZİNİ

ºC	Santigrat Derece
µL	Mikrolitre
µM	Mikrometre
mL	Milimetre
nm	Nanometre
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
OD	Optik Yoğunluk

KISALTMALAR DİZİNİ

AK	Amikasin
AM	Ampisilin
AMC	Amoksisilin
ATCC	American Type Culture Collection
C	Kloramfenikol
CFU	Colony Forming Unit
CLSI	Clinical and Laboratorty Stand ards Institute
CN	Gentamisin
DPPH	α- difenil-β-pikril hidrazil
E	Eritromisin
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
GIT	Gastro İntestinal Sistem
GRAS	Generally Recognised as Safe/ Genelde Güvenilir olarak Bilinen
K	Kanamisin
LAB	Laktik Asit Bakterileri
MRS	de Man, Rogosa and Sharpe
NA	Nalidiksik Asit
NCCLS	National Committee on Clinical Laboratory Stand ards
OB	Kloksasilin
OFX	Ofloksasin
PBS	Phosphate Buffered Saline/ Fosfat Tampon Çözeltisi
PCR	Polymerase Chain Reaction
P	Penisilin
SB	Sodium Benzoate / Sodyum Benzoat
SF	Serum Fizyolojik
UNICEF	Birleşmiş Milletler Çocuklara Yardım Fonu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Sağlıklı bir vücut sisteminde doğal mikroflora ve oksidan – antioksidan mekanizması dengelidir. Ancak çevre, stres, sağlıksız ve yetersiz beslenme, bilinçsiz antibiyotik kullanımı, alkol, sigara kullanımı gibi etmenler vücut oksidan-antioksidan mekanizmasını ve intestinal sistemde bulunan doğal mikroflora dengesinin bozulmasına ve doğal mekanizmaların yetersiz kalmasına neden olmaktadır. Bu gibi durumlarda dışarıdan alınan ek gıdalar dengenin korunmasına ve modülasyonuna yardımcı olmaktadır.

Laktik asit bakteri (LAB), insan ve hayvan gastrointestinal sisteminde, ürogenital sisteminde, üst solunum sisteminde, ağız boşluğu mikroflorasında doğal kolonize olabilmelerinin yanısıra, süt ve süt ürünleri, et, sebze ve meyvelerden elde edilmiş fermente ürünlerin yapısında da bulunmaktadır. Laktobasiller ve bifidobakteriler, bağışıklık sisteminin modülasyonu, kanserin önlenmesi, bağırsak fonksiyonlarının iyileştirilmesi, lipid ve glikoz metabolizmasını düzenlenmesi ve hipokolesterolemik etki yoluyla insan sağlığına yarar sağlayan ve probiyotik kültür olarak en çok kullanılan mikroorganizmalardır (Darsanaki vd., 2013; Kang vd., 2013).

Lactobacillus cinsi şu anda 140 tür ve 30 alt tür içeren en büyük LAB grubudur. Bu sayılar, modern moleküler biyoloji yöntemleri ve bütün genom tabanlı teknikler temelinde sürekli olarak değerlendirilmektedir. *Lactobacillus* türleri fermantasyon karakterlerine dayanarak fakültatif homofermatif, fakültatif heterofermentatif ve zorunlu heterofermentatif olmak üzere üç gruba ayrılabilir. Bunun yanı sıra 16S filogeni tekniği kullanılarak *Lactobacillus* türleri *L. casei-Pediococcus* grubu, *Leuconostoc* grubu ve *Lactobacillus acidophilus* /*delbrueckii* grubu olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Daha sonra, tekrar 16S rDNA sekanslarına dayanarak, Lactobacillus türleri *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus salivarius, Lactobacillus reuteri, Lactobacillus buchneri* ve *Lactobacillus plantarum* grubu olmak üzere 5 ayrı çatı altında sınıflandırılmıştır. Ancak filogenetik belirteçler olarak 16S rRNA genlerinin kullanımları eleştirilerek bu sınıflandırmalar genellikle yetersiz olarak kabul edilmiştir. Laktobasiller türlerinin sınıflandırılması için ortaya konulan yeni öneriler ile cinsin yedi veya sekiz gruba ayrılabileceğini iddia edilmektedir

(Korhonen, 2010). *L. acidophilus* grubu (*L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri* ve *L. johnsoni*), çok uzun yıllardan beri insan sağlığına yararları ve güvenilir kullanımı nedeniyle "genel olarak güvenli" şeklinde tanımlanan bakteriler olarak sınıflandırılmaktadır (Mayrhofer vd., 2008).

Anne sütü yeni doğan bağırsak mikrobiyotasının oluşumu ve gelişiminde önemli rol oynayan anahtar faktördür. Şu ana kadar yapılan çalışmalarda anne sütünün ihtiva ettiği *Lactobacillus* türlerinden ağırlıklı olarak *L. gasseri*, *L. fermentum* ve *L. salivarius* suşlarının izole edildiği rapor edilmiştir (Martín vd., 2005; Jiménez vd., 2008). *L. gasseri*, insan gastrointestinal sistem ve ağız boşluğu, vajinal sistem gibi mukozal yüzeylerde kolonize olan, düşük GC (guanin/sitozin) oranına sahip, homofermentatif ve gram pozitif bir laktik asit bakterisi olarak karakterize edilmektedir (Di Luccia vd., 2013). *L. gasseri* yaygın bir şekilde probiyotik olarak kullanılmaktadır ve insan sağlığı üzerine bağırsak fonksiyonlarını düzenlenmesi, bakteriyosin üretimi, immun yanıtın düzenlenmesi ve arttırılması, serum kolesterol seviyesinin düşürülmesi gibi terapötik etkileri bulunmakta ancak bu etkilerin suşa bağlı olarak değişmekte olduğu belirtilmektedir (Kawase vd., 2011; Selle ve Klaenhammer, 2013; Kim ve Rajagopal, 2001).

Probiyotik bir kültür olarak karakterize edilecek olan suşun, sağlığı teşvik edici etkilerinden yararlanılabilmesi, farmasötik ve gıda proseslerinde kullanılabilmesi için, antibiyotik toleransı, safra toleransı ve gastrik sıvı toleransı, antimikrobiyal bileşenlerin üretimi gibi in vitro seçim kriterlerini sağlaması gerekmektedir (Hoque vd., 2010). Bu alanların yanı sıra, bugün çok sayıda mikroorganizma kaynaklı amilaz enzimleri bitki ve hayvan kaynaklı enzimlere göre daha stabil (kararlı) olmaları nedeniyle, ticari olarak nişastanın kimyasal hidrolizi amacı ile nişasta işleme endüstrisinde neredeyse tamamen yerini almıştır ve çok geniş bir yelpazede kullanılmaktadır (Souza, 2010).

Bu çalışma kapsamında anne sütünden izole edilen altı adet *L. gasseri* MA suşunun, PCR tanımla yöntemi ile moleküler olarak identifikasyonu yapılarak, biyoproseslerde probiyotik kültür olarak faydalanma potansiyelinin belirlenmesi amacıyla stres koşullarına (antibiyotik, safra suyu, yapay mide sıvısı, yapay ince bağırsak sıvısı, düşük pH değerleri) direnç özellikleri in vitro koşullarda tespit edilmiştir. MA suşlarından gıda, yem, farmakoloji endüstrilerinde biyo-koruyucu olarak yararlanma imkanlarının belirlenmesi amacıyla sodyumbenzoat gıda katkı maddesi direnç özellikleri, insan-gıda, Candida sp. türleri ve balık patojenleri olmak üzere hastalık

etmeni olarak en çok rastlanan patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteleri, agregasyon özellikleri, hemolitik aktiviteleri ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikiminin engellenmesi amacıyla suşların antioksidan aktivitesi test edilmiştir. Ayrıca MA suşların gıda, tekstil, kağıt endüstrisi, yem sanayi gibi birçok alanda geniş ölçüde kullanılan ve endüstriyel birer enzim olan alfa-amilaz aktiviteleri araştırılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Anne Sütünün Genel Özellikleri ve Mikrobiyal İçeriği

Anne sütü yeni doğanlarda sağlıklı ve hızlı bir gelişim için gerekli olan, zengin besin değeri ve kompleks mikrobiyal içeriği ile gastrointestinal sisteminin olgunlaşmasını ve immun sistemin gelişmesini sağlayan eşsiz spesifik bir biyolojik sıvı olarak tanımlanmıştır (Fernández vd., 2013). Birleşmiş Milletler Çocuklara Yardım Fonu (UNICEF) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ortaklığı ile 1992 yılında yayınlanmış bir bildirgede (Innocenti Bildirgesi) anne sütünün bebeklerin gelişimi için en sağlıklı besin maddesi olduğu, bu nedenle ilk altı ayda yalnızca anne sütü ile beslenmenin ve sonrasında ek gıdalar ile birlikte iki yaşına kadar anne sütüne devam edilmesinin önemi vurgulanmıştır (Gün vd., 2009).

Anne sütünün koruyucu rolü içeriğindeki karbonhidratlar, nükleotidler, yağ asitleri, immünoglobulinler, sitokinler, bağışıklık sistem hücreleri, lizozim, laktoferrin ve diğer immünomodülatör faktörler gibi bileşenler geniş bir sinerjistik etki sonucu sağlığı teşvik etmekte olduğu belirlenmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda insan sütünde eksozomlar ve micro RNA gibi bağışıklık düzenleyici faktörlerin varlığı tespit edilmiştir. Sağlıklı kadınların sütleri yaklaşık 10^3-10^4 cfu/mL potansiyel bakteriyi yeni doğanların gastrointestinal sistemine sürekli bir kaynak olarak aktarmaktadır. Bu anlamda anne sütü mikrobiyomları yaşamın başlangıcında steril olan gastrointestinal sistem için bir aşı olarak kabul edilmektedir. Bunun yanı sıra süt mikrobiyomları, emziren kadınların meme sağlığı için bir çok önemli bir rol oynadığı yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Dahası bu süt mikrobiyomlarının kullanımı genellikle vajinal enfeksiyonlar ve meme iltihabı gibi hastalıkların antibiyotik tedavisi ile oluşabilecek ağrılı yan etkilerden annelerin korunmasını sağladığı belirtilmiştir (Jeurink vd., 2012).

Anne sütü yapısında bulunan çeşitli vitamin, mineral, hormonlar, oligosakkaritler, glikoproteinler, yağ asitleri gibi biyoaktif faktörleri içermesinin yanı sıra ayrıca probiyotik özellik taşıyan (bilhassa *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium*) mikrobiyal çeşitliliği ile çeşitli kronik hastalıklar, diş çürükleri, obezite, alerjik hastalıklar, diyabet, ülseratif kolit, enfeksiyonel hastalıklar ve lösemiye karşı koruyarak bedensel ve zihinsel gelişimi sağlamaktadır. Yapılan birçok çalışmada 16S rDNA genleri üzerinde moleküler tabanlı genetik identifikasyon teknikleri ile anne sütü mikrobiyomunda *Lactobacillus, Staphylococcus, Enterococcus, Bifidobacterium, Streptococcus* grubu bakterilerin ağırlıklı olarak bulunduğu ve günlük 1.10^5 - 1.10^7 civarında bakterilerin anne sütü aracılığı ile gastro intestinal sisteme transfer edildiği tespit edilmiştir (Soto vd., 2014). Önceki çalışmalarda, sağlıklı kadınların sütlerinin, bebek bağırsağına transfer edilen önemli bir laktik asit bakteri kaynağı olduğu ve bu biyolojik sıvının ihtiva ettiği ana türler arasında *Lactobacillus gasseri* suşunda bulunduğu rapor edilmiştir (Olivares vd., 2006).

Özellikle anne sütünden izole edilen ve probiyotik kültür olma potansiyeli taşıyan *Lactobacillus gasseri, Lactobacillus salivarius, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus fermentum* gibi Lactobacillus cinsi bakteriler üzerine ilgi giderek artmaktadır (Lara-Villoslada vd., 2007). Bu bakterilerin gastro intestinal sistemde baskın hale gelerek, ürettikleri bakteriyosin, organik asit, hidrojen peroksit gibi antimikrobiyal özellik gösteren çeşitli ajanlar ile doğal mikrofloranın dengesini sağladığı, bakteri ve maya kaynaklı enfeksiyonlara karşı konakçı sağlığını koruduğu rapor edilmiştir (Collado vd., 2009).

Çizelge 2.1: Anne sütünden izole edilen mikroorganizmalar (Bağcı, 2015).

Metot	**Türler**
Mikrobiyal İzolasyon	*Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus gasseri, Lactobacillus crispatus, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus reuteri, Lactobacillus casei, Lactobacillus vaginalis, Lactobacillus animalis, Lactobacillus brevis, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus oris, Lactobacillus spp., Lactococcus lactis, Bifidobacterium adolescentis, Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium breve, Bifidobacterium longum, Leuconostoc mesenteroides,*
Mikrobiyal İzolasyon	*Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus, Staphylococcus capitis, Staphylococcus hominis, Streptococcus mitis, Streptococcus salivarius,Streptococcus parasanguinis, Streptococcus oris, Streptococcus australis Streptococcus gallolyticus, Streptococcus vestibularis, Streptococcus spp., Enterococcus faecium, Enterococcus faecalis, Enterococcus durans, Enterococcus hirae,Enterococcus mundtii, Enterococcus spp., Rhodotorula mucilaginosa, Pediococcus pentosaceus, Pediococcus pentosaceous, Kocuria rhizophila, Corynebacterium spp., Peptostreptococcus spp.*

Çizelge 2.1 (devam): Anne sütünden izole edilen mikroorganizmalar (Bağcı, 2015).

DNA sekans analizi	*Lactobacillus fermentum, Lactobacillus gasseri, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus spp., Lactococcus lactis, Leuconostoc citreum, Leuconostoc fallax, Enterococcus faecium, Enterococcus faecalis, Enterococcus spp., Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus hominis, Streptococcus mitis, Streptococcus parasanguinis, Streptococcus salivarius, Staphylococcus spp., Streptococcus spp., Bifidobacterium longum, Bifidobacterium adolescentis, Bifidobacterium animalis, Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium breve, Bifidobacterium catenolatum, Bifidobacterium longum, Weissella cibaria, Weissella confusa, Propionibacterium acnes, Clostridium spp., Corynebacterium spp., Bradyrhizobiaceae, Propionibacterium spp., Pseudomonas.*

2.2 Gastrointestinal Sistem Mikrobiyotası

İnsanlar da dahil olmak üzere tüm omurgalı canlıların gastrointestinal sistemi (ağız boşluğu, mide, ince bağırsak, kalın bağırsak, rektum gibi farklı habitatlar) ağırlıklı olarak bakteri türlerinin bulunduğu çok geniş bir mikrobiyal topluluğa ev sahipliği yapmaktadır. İnsan gastrointestinal sistem (GIT) florasında bulunan mikrobiyal türlerin anatomik, immünolojik ve fizyolojik özellikleri karakterize edilip incelendiğinde, gastrointestinal sistemin şaşırtıcı derece çeşitlilik gösteren ekolojik nişleri ihtiva ettiği belirlenmiştir (Walter, 2008). GIT sistemde yaklaşık 10^{13}-10^{14} civarında aktif, yoğun ve oldukça çeşitli bir mikrobiyal popülasyon bulunmaktadır ve bu sistemin insan genom sayısından en az 100 kat fazla gen içeren 1000 den fazla kommensal türü kapsadığı düşünülmektedir (Vélez vd., 2007).

Bağırsak mikrobiyota bileşimi yaş, cinsiyet, etnik köken, beslenme tarzı gibi bir takım etmenlere bağlıdır ve probiyotik, prebiyotik, antibiyotikler gibi etmenlerle ise modüle edilebilir. Yaşamın ilk evrelerinde anneden vajinal, deri ve anne sütü kaynaklı olmak üzere *Bifidobacterium, Lactobacillus* ve *Enterococcus* gibi birçok öncü mikroorganizma yeni doğanlara dikey geçiş ile aktarılarak tamamen steril olan GIT sisteminde kolonize olduğu ve sonraki dönemlerde ise anaerob bakterilerin mikrobiyal topluluğa egemen olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Dört ile altıncı aylar arasında katı gıda takviyesinin başlaması ile birlikte clostridial türler (*Lachnospiracea, Clostridiaceae* ve *Ruminococcaceae*), takibindeki aylarda ise Ruminococcaceae ailesinin üyelerinde bir artış görünmektedir. 2-3 yaş aralığında mikrobiyota bileşiminde daha sonra yetişkinlikte de stabil kalan *Bacteroidaceae, Lachnospiraceae* ve *Ruminococcaceae* gibi türler kolonize olmaktadır. Ekolojik teorite göre zamanla bu öncü türler daha kompleks ve daha stabil bir erişkin ekosistemin oluşumunu sağladığı düşünülmektedir (Groer vd., 2014; Dominguez vd., 2011; Arrieta vd., 2014; Million vd., 2013). Genel olarak yüksek mikrobiyal çeşitliliğin sağlıklı bir intestinal mikrobiyota ile ilişkili olduğu düşünülürken, mikrobiyal çeşitliliğin azalması hastalıklarla bağdaştırılmaktadır (Scott vd., 2015).

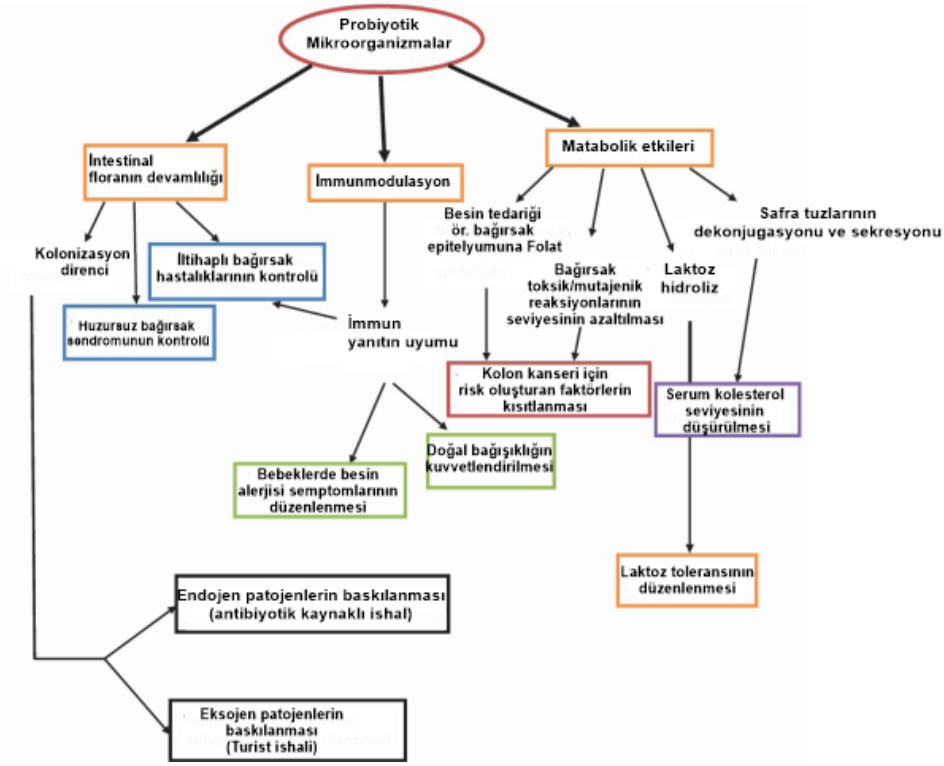
Kolon mikroflorasının temel fonkiyonu sindirilemeyen besin maddesi kalıntılarının ve epitelyum tarafından üretilen endojen mukusun fermentasyonunu sağlamaktır. Doğal mikroflora üyeleri mevcut mukozal alanlara (adezyon alanları) kolonizasyon ile bir bariyer oluştuştururlar. Bu alanlarda hastalık etmeni endojen patojen mikroorganizmalar ile çeşitli substratlar için rekabet oluşturmakta ve kısa zincirli yağ asitleri ve bakteriyosinler gibi düzenleyici faktörlerin üreritimi ile gastrointestinal sistemde bu patojenlerin kolonizasyonlarını engellemektedirler (Hao ve Lee, 2004). Yapılan çalışmalar intestinal mikroflora kondisyonunun, obezite patogenezi, insulin direnci, damar sertleşmesi (ateroskleroz) ve tip 2 diyabet gibi hastalıların önlenmesinde önemli rol oynadığı göstermiştir (Węgielska ve Sulibursk a, 2016).

2.3 Probiyotik Mikroorganizmalar

Probiyotikler ilk olarak Kollath tarafından 1953 yılında zararlı etkileri olan antibiyotiklerin aksine organik ve inorganik gıdaların yapısında bulanan doğal bileşenler olarak tanımlanmıştır (Kotikalapudi, 2009). Fuller (1992) probiyotik terimini mikrobiyal dengeyi sağlayarak konakçı üzerinde faydalı etkileri olan 'canlı mikrobiyal besin katkısı' olarak tanımlanmıştır. Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tanımına göre ise probiyotik mikroorganizmalar yeterli miktarda alındıklarında konakçı sağlığı üzerinde terapötik etkileri bulunan 'yaşayan mikroorganizmalar' olarak değerlendirilmiştir (Grajek vd., 2005).

Probiyotik mikroorganizmalar gram pozitif, çubuk ya da kok şeklinde, anaerobik veya fakültatif anaerobik bakteri ya da maya türlerini kapsamaktadırlar. Probiyotik mikroorganizmaların intestinal mukozaya tutunarak epitelyal bariyeri genişlettikleri, üretmiş oldukları çeşitli antimikrobiyal maddeler ile patojen mikroorganizmaların gelişimini inhibe ettikleri ve bu sayede intestinal sistemin dengeli, sağlıklı ve dinamik olmasına katkı sağladıkları belirlenmiştir (Bermudez-Brito vd., 2012).

Bunun yanı sıra probiyotik bakteriler ürogenital sistem, üst solunum yolu sistemi, ağız boşluğu gibi mukozal alanlarda da kolonize olarak konakçı sağlığı üzerine faydalı etkiler sağlamaktadır. Probiyotik mikroorganizmalar soğuk algınlığı, grip, kulak-burun boğaz enfeksiyonları, ürogenital enfeksiyonlar, atopik dermatit (egzema), alerjik burun iltihabı gibi hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği gibi, bir aşı adjuvanı olarak kullanılabilmektedir (Tandee, 2013).



Şekil 2.1: Probiyotik mikroorganizmaların etki mekanizaması (Hamasalim, 2015).

Bir mikroorganizmanın probiyotik kültür olarak değerlendirilebilmesi için, insan kaynaklı olması, non-toksik olması, virülens faktörleri taşımaması, mide ve safra suyu toleransının bulunması, bağırsak epitel yüzeylerine tutunup burada kolonize olabilmesi, çeşitli antimikrobiyal maddeler üreterek patojen mikroorganizmalara karşı antagonistik etki göstermesi, antibiyotiklere dinçli olması gibi bir takım özellikleri taşıması gerekmektedir (Yangilar, 2015).

Probiyotik olarak değerlendirilen mikroorganizmalar (çoğunlukla bakteri nadir olarak mayalar) genellikle *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. rhamnosus* ve *L. acidophilus* (çoğunlukla *L. acidophilus* grubu olarak değerlendirilen *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri* ve *L. johnsoni*), *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Saccharomyces* ve *Enterococcus* gibi gruplar olmasına rağmen *Lactobacillus* türleri probiyotik kültür olarak en sık yararlanılan türlerdir (Georgiev vd., 2015; Masuda vd., 2005).

Probiyotik mikroorganizmalar çok eski zamanlardan beri gıda işlemede özellikle süt ve süt ürünlerinde doğal gıda bileşenleri olarak kullanılmalarının yanı sıra aynı zamanda tıbbi amaçlı ve tarım-su ürünleri endüstrilerinde de kullanılmaktadırlar. Probiotik gıda veya takviyelerinin, sindirim sistemindeki mevcut mikrobiyal florayı (hem faydalı hem de hedef patojen mikroorganizmalar) tahrip eden ancak bazı hastalıklar giderilmesinde uygulanan antibiyotik tedavisinden sonra tüketilmesi oldukça önemli bir husus olarak belirtilmektedir. Probiyotiklerin küresel pazarladaki talebi 2007'de 14.9 milyar dolar, 2008'de 15.9 milyar, 2011 yılında 27.9 milyar dolarken, 2018 yılında % 7 lik bir büyüme ile 44.9 milyar dolara ulaşacağı tahmin edilmektedir (Soccol vd., 2010; Nguyen vd., 2016).

2.4 Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri

Laktik asit bakterileri (LAB) terimi 20. yüzyılda yavaş yavaş kabul edilmeye başlanmış olsada bu bakteri grubu daha eski zamanlarda süt kaynağı ve laktik asit üreten gibi isimler ile bilinirdi. Laktik asit bakterileri fermentasyon özelliği taşıyan, yüksek endüstriyel önemi bulunan, ekolojik olarak çok çeşitli mikroorganizma grubudur (Sharma vd., 2012). Bu bakteri grubu gram pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmayan, anaerobik koşulları tercih eden ancak aero-toleranslı, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* ve *Lactobacillus* gibi birçok cinsi kapsayan çubuk ya da kok şeklinde mikroorganizmalardır (Chartie ve Kulakauskas, 2014; Muhialdin vd., 2011).

LAB genellikle farklı ebatlarda plazmidlere sahiptir ve plazmidler üzerinde bazı antibiyotik direnç lokasyonlarının *L. lactis* ve çeşitli *Lactobacillus* ve *Enterococcus* türlerinde belirlendiği olduğu rapor edilmiştir. LAB yapısal (intrinsik) veya kalıtsal, kazanılmış ve mutasyonel olarak gözlenen üç farklı antibiyotik direnç çeşidi vardır. LAB'nin intrinsik, kromozomal olarak kodlanmış direnç özelliklerinin karakterize edilmesi yaygın antibiyotiklere karşı direnç özelliklerini tanımak için gereklidir. Avrupa Komisyonunun raporlarına göre, eksojen direnç genlerinin başka bir suştan yatay olarak aktarılması ile elde edilen direnci taşıyan suşların hayvansal gıda katkıları olarak kabul edilemez olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte *Lactobacillus* suşlarının kloramfenikol, streptomisin, gentamisin, penisilin G, tetrasiklin ve eritromisin antibiyotiklerine karşı yapısal olarak duyarlı, aminoglikozid, florokinolon, glikopeptit

ve vankomisin antibiyotiklerine ise yapısal olarak dirençli oldukları rapor edilmiştir (Patel vd., 2012).

Çizelge 2.2: Çeşitli hastalıkların tedavi süreçlerinde kullanılan bazı klinik antibiyotikler ve etki mekanizmaları (Devirgiliis vd., 2013).

Antibiyotikler	Farmakolojik Sınıf	Etki Mekanizmaları
Eritromisin	Makrolidler	Hedef: Ribozom, İnhibisyon alanları: Protein sentezi, hedef bölge değişiklikleri (metilazlar) Efflux, Enzimatik inaktivasyon
Amikasin	Aminoglikozid	Hedef: Ribozom, İnhibisyon alanları: Enzimatik inaktivasyon, hücre geçirgenliği modifikasyonları, hedef bölge mutasyonları (ribozom bağlanma bölgelerindeki değişiklikler)
Gentamisin	Aminoglikozid	Hedef: Ribozom, İnhibisyon alanları: Enzimatik inaktivasyon, hücre geçirgenliği modifikasyonları, hedef bölge mutasyonları (ribozom bağlanma bölgelerindeki değişiklikler)
Kanamisin	Aminoglikozid	Hedef: Ribozom, İnhibisyon alanları: Enzimatik inaktivasyon, hücre geçirgenliği modifikasyonları, hedef bölge mutasyonları (ribozom bağlanma bölgelerindeki değişiklikler)
Amoksisilin	Beta Laktam	İnhibisyon bölgeleri: Hücre duvarı sentezi, Enzimatik inaktivasyon (β-laktamaz) Hedef bölge mutasyonları (değiştirilmiş penisilin bağlayıcı proteinler), Hücre geçirgenliğinin modifiye edilmesi
Ampisilin	Beta Laktam	İnhibisyon bölgeleri: Hücre duvarı sentezi, Enzimatik inaktivasyon (β-laktamaz) Hedef bölge mutasyonları (değiştirilmiş penisilin bağlayıcı proteinler), Hücre geçirgenliğinin modifiye edilmesi
Penisilin	Beta Laktam	İnhibisyon bölgeleri: Hücre duvarı sentezi, Enzimatik inaktivasyon (β-laktamaz) Hedef bölge mutasyonları (değiştirilmiş penisilin bağlayıcı proteinler), Hücre geçirgenliğinin modifiye edilmesi

Çizelge 2.2 (devam): Çeşitli hastalıkların tedavi süreçlerinde kullanılan bazı klinik antibiyotikler ve etki mekanizmaları (Devirgiliis vd., 2013).

Kloksasilin	Beta Laktam	İnhibisyon bölgeleri: Hücre duvarı sentezi, Enzimatik inaktivasyon (β-laktamaz) Hedef bölge mutasyonları (değiştirilmiş penisilin bağlayıcı proteinler), Hücre geçirgenliğinin modifiye edilmesi
Kloramfenikol	Kloramfenikol	Hedef: Ribozom, İnhibisyon alanları: Protein sentezi, Enzimatik inaktivasyon (esas olarak deasetilazlar, fosfotransferazlar), Efüzyon hedef bölge mutasyonları, Hücre geçirgenliğinin modifikasyonu
Nalidiksik Asit	Kinolon	DNA giraz, DNA topoizomeraz, Hedef bölge mutasyonları, Hücre geçirgenliğinin modifikasyonu, düşük hedef ekspresyon seviyesi
Ofloksasin	Kinolon	DNA giraz, DNA topoizomeraz, Hedef bölge mutasyonları, Hücre geçirgenliğinin modifikasyonu, düşük hedef ekspresyon seviyesi

Laktik asit bakterileri insan ve hayvan gastrointestinal sisteminde, ürogenital sisteminde, üst solunum sisteminde, ağız boşluğu mikroflorasında doğal olarak bulunmasının yanı sıra, süt ve süt ürünleri, et, sebze ve meyvelerden elde edilmiş fermente ürünlerin yapısında da bulunan heterojen bir gruptur. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* spp. türleri kommensal bağırsak florasının baskın ve önde gelen üyeleridir ve konakçı sağlığı üzerine laktoz in-toleransının azaltılması, kan kolestrol seviyesinin dengelenmesi, ishal ve bağırsak enfeksiyonlarının önlenmesi, immun yanıtın güçlenmesi gibi doğrudan veya dolaylı bir çok etkileri olduğu tespit edilmiştir (Darsanaki vd., 2013).

Lactobacillus ve diğer laktik asit bakteri patojen mikroorganizmalar ile besin rekabetinde bulunarak ve laktik asit, asetik asit, hidrojen peroksit, bakteriyosin (nisin, laktasin, diplokokin, asidofilin, bulgarikan, helvetisin ve plantarisin), protezlar, lizozim, reuterin gibi düşük molekül ağırlıklı bileşikler, diasetil, antifungal bileşikler, fenil laktik asit gibi kimyasal salgılar ile patojen mikroorganizmaların gelişlerini inhibe etme potansiyeline sahip oldukları belirlenmiştir (Arqués vd., 2015). LAB gibi gram pozitif mikroorganizmalardan izole edilen bakteriyosinler, özellikle süt ve süt

ürünleri endüstrisinde biyolojik koruyucu bileşenler olarak kullanımları ve ayrıca insanlar üzerinde göstermiş oldukları terapötik etkiler dolayısıyla çok fazla dikkat çekerek yoğun bir araştırma konusu haline gelmiştir. Bakteriyosinigenik laktik asit bakterileri veya bu bakterilerin sentezlemiş oldukları bakteriyosinler, gıda ürünleri ve yemlerde patojen mikroorganizmaların gelişimlerini kontrol etmek ve mikroorganizma kaynaklı bozulmaların önüne geçmek için güvenli katkı maddeleri (GRAS) olarak kullanılmaktadır. Özellikle *L. acidophilus* ve bunun yanısıra *L.* gasseri, *L. johnsonni* gibi *Lactobacillus* suşlarının bağırsaklarda bakteriyosin üretimi, kolonizasyon ve yüksek rekabet özelliklerinin olduğu düşünülmektedir. Bazı laktik asit bakterileri tarafınfan salgılanan bakteriyosinlerin ayrıca virüsler üzerinde de etkili olduğu belirtilmiştir (Ghosh vd., 2014; Djadouni ve Kihal, 2012; Zhu vd., 2000; Gülgör ve Özçelik, 2014). Laktik asit bakterileri ya da laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal özelliğe sahip metabolik ürünleri, gıdalarda kontaminasyon etmeni olan (*Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* vb.) istenmeyen mikroorganizmaları inaktive edilmesi, gıdaların mikrobiyal bozulmalara karşı korunması, raf ömrünün uzatılması ve bozulmalara bağlı ekonomik kayıpların önlenmesi amacı ile biyokoruyucu olarak kullanılmaktadırlar (Seçkin vd., 2010).

2.5 *Lactobacillus gasseri*

L. gasseri, L. acidophilus'dan morfolojik olarak çok az bir farklılık göstermesi, karbonhidrat kullanımı ve üretilen laktik asit izomerleri gibi klasik taksonomik özelliklere göre ayırt edilememesi nedeniyle rutin olarak *L. acidophilus* olarak sınıflandırılmıştır. Ancak *L. gasseri, Lactobacillus* türlerinin laktat dehidrogenazları ve *L. acidophilus*'un DNA/DNA hibridizasyon kalıpları üzerinde çalışmış olan Francis Gasser'den sonra *L. acidophilus'*dan ayırt edilebilmiştir (Cunha, 2011).

L. gasseri, gastrointestinal sistem, ağız boşluğu ve vajinal sistemde doğal olarak bulanan, homofermentatif ve termofilik bir suştur ve en iyi bilinen 50 *Lactobacillus* türünden biridir. *L. gasseri,* B grup acidophilus kompleks mikroorganizmalarından olup ve belirgin ana yüzey katman (S katmanı) proteinlerinin bulunmaması ve genetik identifikasyon yöntemleri ile A grubu üyelerden ayırt edilebilmektedir. *L. gasseri* her ne kadar S katman proteinlerini kodlayan genlerden yoksun olsada, çeşitli özellikler yönünden *L. acidophilus'un* S katmanı proteinleriyle benzerlikler taşıyan ve

'agregasyon arttırıcı faktörler' (Apf) olarak adlandırılan proteinleri kodlama özelliğini taşıdığı belirtilmiştir (Cunha, 2011).

Yapılan bazı çalışmalarda *Lactobacillus* cinsi bakteri katkılarının *Helicobacter pylori* tedavisinde geniş bir terapötik etki gösterdiği, bunun yanısıra deney hayvanları ve insanlar ile gerçekleştirilen çalışmalar ise *L. gasseri* OLL 2716 (LG21) suşunun mide mukozal yüzeylerinde *H. pylori* kolonizasyonu baskıladığı bildirilmiştir (Fujimura vd., 2006). *L. gasseri* suşlarının yağ taneciklerini bağlayarak kolesterol ve yağ asitlerinin emilim inhibisyonunu arttırdığı rapor edilmiştir (Hamad vd., 2009).

Çalışmalarda geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivite gösterdiği saptanan *L. gasseri* LA158 suşunun Gassericin T, *L. gasseri* SBT 2055 suşunun Gassericin T, *L. asseri* LA39 suşunun Gassericin A ve *L. gasseri* KT7 suşunun Gassericin *KT7, L. gasseri* LF221 suşunun ise Acidocin LF221 A ve B bakteriyosinlerini üretmiş oldukları tespit edilmiştir (Arakawa vd., 2009; Rogelj ve Matijašić, 2006).

L. gasseri suşu spesifik bir safra tuzu hidrolaz enzimi içermekte olduğu ve *L. acidophilus'*a benzer bir safra toleransı gösterdiği belirlenmiştir (Selle ve Klaenhammer, 2013).

L. gasseri, probiyotik suş olarak kullanılmasının yanı sıra aynı zamanda süt ve süt ürünleri için starter kültür olarak da kullanılmaktadır. Ancak *L. gasseri* fermente ürünler için katkı maddesi olarak kullanılan sodyum klorür ve sodyum nitrit (et ürünleri temel bileşenleri) gibi maddelere kısmen duyarlı olduğu için fermente et gibi gıdaların üretiminde kullanımının sınırlı olduğu belirtilmiştir (Arihara ve Itoh, 2000).

3. MALZEME ve YÖNTEM

3.1 Laktik Asit Bakteri Suşları

Deneylerde daha önce yürütülen bir proje kapsamında farklı gönüllü annelerin sütlerinden izole edilen altı adet *L. gasseri* MA suşunun, hizmet alımı yapılarak (iontek) PCR tabanlı moleküler tanımlama yöntemi ile genetik identifikasyonu yapılmıştır.

L. gasseri MA suşları Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi, Biyoteknoloji Laboratuvarı bünyesinde MRS sıvı/katı besiyerlerinde pasajları alınarak gliserol stoklarda +4^{o}C muhafaza edilmiştir.

3.2 MA Suşlarının Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.1 MA Suşlarının Antibiyotik Hassasiyetlerinin Belirlenmesi

Anne sütü kaynaklı *L. gasseri* MA suşlarının, Makrolid grubu (Eritromisin), Aminoglikozid grubu (Amikasin, Gentamisin, Kanamisin), Beta Laktam grubu (Amoksisilin, Ampisilin, Penisilin G, Kloksasilin), Kloramfenikol grubu (Kloramfenikol), Kinolon grubu (Nalidiksik Asit, Ofloksasin) olmak üzere mikroorganizma kökenli hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılan on bir adet klinik ticari antibiyotik diskine karşı hassasiyetleri disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir.

Gliserol stoklarda muhafaza edilen *L. gasseri* MA suşları MRS sıvı besiyerinde iki kez aktifleştirilmiş ve aktif kültürlerinin hücre yoğunlukları serum fizyolojik çözeltisi (SF: % 0.865 g NaCl) içerisinde Mc Farland 0.5 sistemi esas alınarak ayarlanmıştır. Konsantrasyonu ayarlanan *L. gasseri* suşları MRS agar besiyerine 100 µl inoküle edilmiş ve streril drigalski spatülü yardımı ile yayma ekim yapılmıştır. Ekimleri yapılan MRS agar petrileri üzerine her bir antibiyotik diski üçer tekrarlı olacak şekilde konuşlandırılmış ve ardından 37^{o}C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda antibiyotik diskleri etrafında oluşan inhibisyon zon çapları kumpas yardımı ile ölçülmüş ve sonuçlar CLSI (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü) 2012'ye göre değerlendirilmiştir (Sharma vd., 2016).

3.2.2 MA Suşlarının Düşük pH Toleransının Belirlenmesi

L. gasseri MA suşlarının farklı pH değerlerine toleransının belirlenmesi için 3.0 M HCl yardımı ile pH değerleri 2 ve 3 olan MRS broth ve kontrol grubu olarak kullanılmak üzere MRS broth besiyerleri hazırlanmıştır. Aktif laktik asit bakteri kültürlerinden pH değerleri ayarlanmış steril MRS ve kontrol grubu MRS besiyerlerine iki tekerrürlü olacak şekilde % 1 oranında inokülasyon yapılmış ve 37 ^{o}C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 0, 1 ve 3. saatlerinde 600 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapılmış ve ayrıca bu saatlerde SF çözeltisine % 1 oranında laktik asit bakteri kültürleri (900 µl SF+ 100 µl laktik asit bakteri kültürü) inoküle edilerek 10^{-1} oranında seri dilüsyonlar oluşturulmuştur. Dilüsyon tüplerinden çift tekerrürlü olacak şekilde MRS agar besiyerlerine 100 µl inokülasyon yapılmış ve anaerobik koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda deney ve kontrol gruplarında koloni sayımı yapılmış ve bu değerler Log (Cfu/mL) cinsinden hesaplanmıştır (Zoral, 2013).

3.2.3 MA Suşlarının Safra Toleransının Belirlenmesi

L. gasseri MA suşlarının safra suyu toleransı spektrofotometrik ve canlı hücre sayımı yöntemleri ile belirlenmiştir. Bu amaçla % 0.3 ve % 1 oranında sarfa (Oxoid) içeren MRS broth ve kontrol olarak kullanılmak üzere safra içermeyen MRS broth besiyeri hazırlanmıştır. Laktik asit bakterileri deney ve kontrol gruplarına çift tekrarlı olacak şekilde % 1 oranında inoküle edilmiştir ve 37^{o}C'de dört saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 0. ve 4. saatlerinde 600 nm'de spektrofotometrik ölçüm ve ayrıca bu saatlerde SF çözeltilerine seri dilüsyonlar yapılmıştır. Dilüsyon tüplerinden iki tekerrürlü olacak şekilde MRS agar besiyerlerine ekim yapılmış ve anaerobik koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda deney ve kontrol gruplarında koloni sayımı yapılmış ve bu değerler Log (Cfu/mL) cinsinden hesaplanmıştır (Tokatlı, 2013).

3.2.4 MA Suşlarının Pepsin Toleransının Belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinin pepsin toleransının belirlenmesi amacıyla fosfat tampon (PBS: % 0.024 g Potasyum di Hidrojen Fosfat (KH_2PO_4), % 0.144 g di-Sodyum Hidrojen Fosfat (Na_2HPO_4), % 0.02 g Potasyum Klorür (KCl), % 0.8 g Sodyum Klorür (NaCl)) çözeltisi kullanılarak in-vitro koşullarda gastrik ortamın sağlanması amacıyla pH 2 ve pH 3 değerlerine sahip solüsyonlar (3 g/L pepsin (Sigma-Aldrich)) hazırlanmıştır. Solüsyonlar 0.22 µm mikro filtreler yardımı ile sterilize edilmiştir. *L. gasseri* MA suşlarının hücre yoğunlukları Mc Farland 0.5 standardı esas alınarak ayarlanmış ve gastrik solüsyonlara % 1 oranında inoküle edilmiştir. Bunun yanı sıra kontrol grubu olarak PBS (pH 7.0) tampon çözeltisine de aynı şekilde inokülasyon yapılmıştır. Kontrol ve test grupları 37ºC'de üç saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 0. ve 3. saatlerinde PBS tampon çözeltilerine 10^{-1} ve 10^{-7} aralığında seri dilüsyonlar yapılmıştır. Dilüsyon tüplerinden iki tekerrürlü olacak şekilde MRS agar besiyerlerine ekim yapılmış ve anaerobik koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda deney ve kontrol gruplarında koloni sayımı yapılmış ve bu değerler Log (Cfu/mL) cinsinden hesaplanmıştır (Yürümez, 2011).

3.2.5 MA Suşlarının Pankreatin Toleransının Belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinin pankreatin toleransının belirlenmesi amacıyla fosfat (PBS pH 8.0) tampon çözeltisi içinde 1 g/L pankreatin (Sigma-Aldrich) ve 0.03 g/L safra (Oxoid) ile yapay ince bağırsak solüsyonu hazırlanmış ve 0.22 µm mikro filtreler yardımı ile sterilize edilmiştir. *L. gasseri* MA suşlarının hücre yoğunlukları Mc Farland 0.5 standardı esas alınarak ayarlanmış ve solüsyonlara % 1 oranında inoküle edilmiştir. Bunun yanı sıra kontrol grubu olarak PBS (pH 7.0) tampon çözeltisine de aynı şekilde inokülasyon yapılmıştır. Kontrol ve test grupları 37ºC'de üç saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 0 ve 3. saatlerinde PBS tampon çözeltilerine 10^{-1} ve 10^{-7} aralığında seri dilüsyonlar yapılmıştır. Dilüsyon tüplerinden iki tekerrürlü olacak şekilde MRS agar besiyerlerine ekim yapılmış ve anaerobik koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda deney ve kontrol gruplarında

koloni sayımı yapılmış ve bu değerler Log (Cfu/mL) cinsinden hesaplanmıştır (Yürümez, 2011).

3.2.6 MA Suşlarının Hemolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi

L. gasseri MA suşlarının hemoliz enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla MRS broth besiyerinde aktifleştirilmiş ve Colombia koyun kanlı agara (OR-BAK) çizgi ekim yapılmıştır. Ayrıca kontrol grubu olarak belirlenen *E. coli* ATCC 35218 (α-hemolitik), *S. aureus* ATCC 25923 (beta hemolitik), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (gama hemolitik) bakteriler de aynı besiyerine çizgi ekim metodu ile ekilmiştir. Ekimi yapılan kontrol grubu ve test grubu bakteriler uygun sıcaklık koşullarında 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kolonilerin etrafında yeşil zon oluşumu α-hemolitik, berrak zon oluşumu beta hemolitik, zon oluşumu gözlenmeyen laktik asit bakterileri gama hemolitik olarak değerlendirilmiştir (Eryılmaz, 2011).

3.3 MA Suşlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

L. gasseri MA suşlarının belirlenen test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesinde kuyu difüzyon metodu uygulanmıştır.

3.3.1 Test Mikroorganizmalarının hazırlanması

Çalışma kapsamında test mikroorganizmaları olarak on beş adet insan-gıda patojeni (*Escherichia coli* ATCC 11229, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus megaterium* (Pasteur Ens.5117), *Salmonella enteritidis* RSKK 171, *Bacillus cereus* RSKK 863, *Bacillus subtilis* RSKK 244, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Micrococcus luteus* NRRL B-4375, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Shigella sonnei* MU:57, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Yersinia enterocolitica* ATCC 11175, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ve *Staphylococcus epidermidis* ATCC 11228), yedi adet balık patojeni (*Vibrio alginolyticus, Vibrio anguillarum* M1, *Vibrio anguillarum* A4, *Aeromonas hydrophila* ATCC 19570, *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri*, *Streptococcus agalactiae*) ve 2

adet maya (*Candida albicans* ATCC 10231 ve *Candida glabrata* RSKK 04019) kullanılmıştır.

Test mikroorganizmaları spesifik besiyerlerinde iki kez aktifleştirilmiş ve yoğunlukları 5 mL'lik serum fizyolojik çözeltisi içerisinde Mc Farland 0.5 standardı esas alınarak ayarlanmıştır. Tüpler deneyde kullanılmak üzere +4ºC'de muhafaza edilmiştir.

3.3.2 *L. gasseri* MA Kültürlerinin Hazırlanması

Antimikrobiyal aktivitenin saptanmasında 18-24 saatlik aktif *L. gasseri* MA suşlarının süpernatantları kullanılmıştır. Bu amaçla laktik asit bakterileri 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj işlemine tabii tutularak bakteri süpernatantları pelletlerden ayrılmıştır. Laktik asit bakteri supernatantları 0.2 µm'lik mikro filtreler yardımı ile filtre edilerek steril cam tüpler içerisine alınmış ve deneyde kullanılmak üzere +4ºC'de muhafaza edilmiştir.

3.3.3 Metodun Uygulanması

Kuyu difüzyon metodunun uygulanmasında konsantrasyonları ayarlanmış patojen test mikroorganizmalar, gelişimleri için spesifik olan katı besiyerlerine 100 µl inoküle edilmiş ve drigalski spatülü yardımı ile ekimleri yapılmıştır.

Ekimi yapılan katı besiyerleri üzerine 7 mm çapında üç tekrarlı olacak şekilde kuyucuklar açılmış ve bu kuyucuklara 100 µl *L. gasseri* MA suşlarının süpernatantları yüklenmiştir. Ardından besiyerleri patojen mikroorganizmaların gelişimi için uygun sıcaklıklarda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklar etrafında oluşan inhibisyon zon değerleri kumpas yardımı ile ölçülmüş ve elde edilen veriler, inhibisyon zon çapı değeri < 8 mm (±), inhibisyon zon çapı değeri 8-10 mm (+), inhibisyon zon çapı değeri > 10 mm (++) ve inhibisyon zon çapı gözlenmeyenler ise (-) olarak değerlendirilmiştir (Campana vd., 2012).

3.4 MA Suşlarının Agregasyon Özelliklerinin Belirlenmesi

3.4.1 Otoagregasyon Özelliklerinin Belirlenmesi

L. gasseri MA suşlarının otoagregasyon yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla şu aşamalar izlenmiştir:

MRS sıvı besiyerinde iki kez aktifleştirilmiş laktik asit bakterileri 5000 rpm'de 15 dakika çöktürülmüştür. Üstte kalan süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet 2 kez PBS tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Pelletler PBS tampon çözeltisi içeren tüpler içerisinde hücre süspansiyon konsantrasyonları 600 nm'de 0.6±0.02 olacak şekilde süspanse edilerek ayarlanmıştır. Konsantrasyonu ayarlanan laktik asit bakterilerinden steril tüplere 2 şer mL üç tekrarlı olacak şekilde alınmış ve vortexlenmiştir. Ardından tüpler 37^{o}C'de 4 saat hareket ettirilmeden inkübasyona bırakılmıştır. Laktik asit bakterilerinin bekletme öncesi OD değerleri kaydedilmiştir. Dört saatlik inkübasyon süresi sonunda bakteri kültürlerinin üst kısmından başka bir deney tüpüne hassas bir şekilde 0.1 mL alınarak 3.9 mL PBS tampon çözeltisi ile süspanse edilmiştir. Örneklerin OD değerleri 600 nm'de ölçülerek bekletme sonrası değerleri kaydedilmiştir. Körv olarak boş PBS tampon çözeltisi kullanılmıştır.

Otoagregasyon değerinin yüzde olarak belirlenmesinde aşağıdaki formül kullanılmıştır;

$$\% \text{ Otoagregasyon} = [(OD1 - OD2)/OD1 \times 100] \quad (3.1)$$

OD1: Bekletme öncesi optikal dansite, OD2: Bekletme sonrası optikal dansite.

L. gasseri MA suşlarının oto-agregasyon özellikleri mikroskobik olarak da gözlenmiştir. Bu amaçla 4 saat inkübe edilen tüplerin dip kısmından mikropipet yardımı ile alınarak gram boyama yapılmıştır. Ardından ışık mikroskobu altında incelenmiştir (Tomás vd., 2005).

3.4.2 Koagregasyon Özelliklerinin Belirlenmesi

L. gasseri MA suşlarının koagregasyon yeteneklerinin belirlenmesinde test mikroorganizmaları olarak beş adet insan-gıda patojeni (*L. monocytogenes* ATCC

7644, *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* O157:H7, *S. enteritidis* ATCC 13076, *S. enteritidis* RSKK 171*) ve* iki adet balık patojeni (*S. agalactiae*, *V. alginolyticus*) kullanılmıştır.

L. gasseri MA suşları ve test mikroorganizmaları 5000 rpm'de 15 dakika çöktürülmüştür. Üstte kalan süpernatant uzaklaştırılmış ve pelletler 2 kez PBS tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Pelletler PBS tampon çözeltisi içeren tüpler içerisinde hücre konsantrasyonları 600 nm'de 0.6±0.02 olacak şekilde süspanse edilerek ayarlanmıştır ve bu değerler bekletme öncesi değerler olarak kaydedilmiştir. Yoğunlukları ayarlanan test bakterileri ve laktik asit bakteri çözeltilerinden steril tüplere üç tekrarlı olacak şekilde eşit miktarlarda alınmış ve vortex cihazı yardımı ile homojenize edilmiştir. Karışık bakteri kültürlerini içeren tüpler 37ºC'de dört saat hareket ettirilmeden inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda tüplerin üst fazından 0.1mL alınarak 3.9 mL PBS tampon çözeltisi ile süspanse edilmiştir. Örneklerin OD değerleri 600 nm'de ölçülerek bekletme sonrası değerleri kaydedilmiştir. Körv olarak boş PBS tampon çözeltisi kullanılmıştır.

Koagregasyon değerinin yüzde olarak belirlenmesinde aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\frac{[OD600\ (L.\ gasseri_{yalnız} + \text{Patojen Test Mikroorganizması}_{\ yalnız})/2] - OD600\ (L.\ gasseri + \text{Patojen Test Mikroorganizması}_{\ karışık\ kültür})}{OD600\ (L.\ gasseri_{yalnız} + \text{Patojen Test Mikroorganizması}_{\ yalnız})/2} \times \%100 \quad (3.2)$$

Bekletme sonrası karışık kültürlerin dip kısmından mikropipet yardımı ile alınarak gram boyama işlemi yapılmış ve *L. gasseri* MA suşlarının koagregasyon özellikleri ışık mikroskobu altında incelenmiştir (Ouwehand vd., 2000).

3.5 Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

L. gasseri MA suşlarının antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla, α- difenil-β-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikalini süpürme ve demir iyonu şelatlama metotları uygulanmıştır.

Her iki metot için laktik asit bakteri hücre süspansiyonlarının yoğunlukları Mc Farland 0.5 standardına göre ayarlanarak kullanılmıştır.

3.5.1 Laktik Asit Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması

Aktif laktik asit bakterilerinin konsantrasyonu steril PBS tampon çözeltisi içeresinde 0.5 Mc Farland standardı esas alınarak ayarlanmıştır.

Bu amaçla laktik asit bakterilerinden steril koşullarda eppendorf tüplerine 1'er mL alınarak 5000 rpm' de 15 dakika santrifüj yardımı ile çöktürülmüştür. Çöktürme sonrası bakteri supernatantları uzaklaştırılmıştır. Elde edilen pelletler 1 mL PBS tampon çözeltisi ile iki kez yıkanmış ve 0.5 Mc Farland standardı temel alınarak 10 mL PBS ile resüspanse edilmiştir.

3.5.2 DPPH Radikali Süpürme Özelliklerinin Belirlenmesi

DPPH indirgeme metodu, mor renkli DPPH serbest radikalinin antioksidan özellik taşıyan bir maddeden proton (hidrojen) alarak indirgenmesi ve reaksiyonun sonunda mor rengin sarıya dönüşmesi esasına dayanır (Mishra vd., 2015). Ticari DPPH radikali hassas terazi yardımı ile 0.002 g tartılarak 100 mL metanolde çözünmesi sağlanmıştır. Hazırlanan DPPH çözeltisinin (0.2 mM) aktivitesini yitirmemesi için ışık görmeyecek bir şişede muhafaza edilmesine ve taze olarak kullanımına özen gösterilmiştir. Hücre konsantrasyonu ayarlanan laktik asit bakterileri solüsyonlarından üç tekrarlı olacak şekilde cam tüplere 0.8 mL eklenerek üzerine 1mL DPPH çözeltisi eklenmiştir. Ardından tüpler vortekslenerek reaksiyonun gerçekleşmesi amacıyla oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 30 dakika bekletilmiştir. Reaksiyon süresi sonunda tüplerdeki DPPH serbest radikalinin mor renginin laktik asit bakterileri tarafından giderilmesine göre antioksidan aktivite aktivite yorumlanmış ve ayrıca tüplerdeki örnekler spektrofotometrede 517 nm dalga boyunda okunmuştur.

Spektrofotometrik ölçüm sırasında körv tüp olarak boş PBS tampon çözeltisi ve kontrol grubu olarak ise 0.8 mL boş PBS+ 1 mL DPPH çözeltisi kullanılmıştır.

L. gasseri MA suşlarının % DPPH serbest radikali süpürme aktiviteleri aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır (Lin ve Chang, 2000).

$$\% \text{ DPPH süpürme kapasitesi} = 1\text{-}OD2/OD1 \times 100 \quad (3.3)$$

OD2: örnek optik yoğunluğu, OD1: (PBS+ DPPH) optik yoğunluğu.

3.5.3 Demir İyonu Şelatlama Aktivitelerinin Belirlenmesi

Demir iyonu şelatlama metodu, kırmızı renkli Fe^{2+}- ferrozin kompleksinin antioksidan bir ajan tarafından indirgenmesine, reaksiyon sonucunda elektron transferinin inhibe edilmesi, oksidasyon reaksiyonunun durdurulması ve kırmızı rengin süpürülmesi esasına dayanır (Soler-Rivas vd., 2000).

L. gasseri MA suşlarının demir iyonu şelatlama aktivitesinin saptanması amacıyla, Ferrozine (5 mM) ve $FeCl_2$ (2 mM) çözeltileri hazırlanmıştır. Hücre yoğunlukları ayarlanan laktik asit bakteri süspansiyonundan üç tekrarlı olacak şekilde cam tüpler içerisine 1'er mL alınmış ve ferrozin çözeltisinden 0.2 mL ve $FeCl_2$ çözeltisinden 0.05 mL eklenerek tüpler vortexlenmiştir. Örnekler spektrofotometrede 562 nm dalga boyunda okutulmuştur.

Spektrofotometrik ölçüm sırasında körv olarak boş PBS tampon çözeltisi ve kontrol grubu olarak 1mL PBS + 0.05 mL $FeCl_2$ + 0.2 mL Ferrozin çözeltisi kullanılmıştır.

L. gasseri MA suşlarının % demir iyonu şelatlama aktivitesi aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır (Abubakr vd., 2012).

% Demir İyonu Şelatlama Aktivitesi;

$$\frac{\text{Kontrol optik yoğunluğu - Örnek optik yoğunluğu}}{\text{Kontrol optik yoğunluğu}} \times 100 \qquad (3.4)$$

3.6 Alfa Amilaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

L. gasseri MA suşları süpernatantları Nutrient agar besiyerine spot ekim yöntemi uygulanarak α-amilaz enzim aktivitesinin belirlenmiştir. Bu amaçla MRS broth besiyerinde iki kez aktifleştirilmiş laktik asit bakterileri 9000 rpm'de 15 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilmiş ve süpernatantlar steril tüplere alınmıştır.

Supernatantlar Nutrient agar besiyerine 20 ve 50 µl olmak üzere iki ayrı konsantrasyonda spot ekim yöntemi ile damlatılmış ve 37ºC'de yarım saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda besiyerlerinin yüzeyi tamamen kaplanacak şekilde iyodin ile boyanmıştır. Spot damlatma yapılan bölgelerde beyaz zon oluşumu α-amilaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Rezzukoğlu, 2011).

3.7 Sodyum Benzoat Direnç Özelliğinin Belirlenmesi

L. gasseri MA suşlarının sodyum benzoat gıda katkı maddesine direnç özellikleri spektrofotometrik ve canlı hücre sayımı ile belirlenmiştir. Bu amaçla % 0.015 ile % 1 aralığında on farklı sodyum benzoat konsantrasyonuna sahip MRS broth ve kontrol grubu olarak kullanılmak üzere MRS broth besiyerleri hazırlanmıştır. Laktik asit bakteri hücre yoğunlukları Mc Farland 0.5 standardı esas alınarak ayarlanmıştır. Yoğunluğu ayarlanan laktik asit bakteri kültürleri farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoat içeren ve içermeyen besiyerlerine % 1 oranında inoküle edilerek 37ºC'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda hücre yoğunlukları (OD) 600 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Canlı hücre sayımı yapmak amacıyla % 0.1 konsantrasyonunda sodyum benzoat içeren MRS broth ve kontrol grubu olarak MRS broth besiyerlerinde geliştirilen laktik asit bakteri kültürleri kullanılmıştır. Test ve kontrol grubu bakteriler SF içerisinde 10^{-1} oranında seyreltilerek 10^{-1}-10^{-8} aralığında seri dilüsyonlar oluşturulmuştur. Laktik asit bakteri dilüsyonlarından iki tekerrürlü olacak şekilde MRS agar besiyerine 100 µL inoküle edilerek yayma ekim yapılmış ve anaerobik koşullarda 37ºC'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda deney ve kontrol gruplarında koloni sayımı yapılmış ve bu değerler Log (Cfu/mL) cinsinden hesaplanmıştır (Gümüştekin, 2010).

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 MA Suşlarının Bazı Probiyotik Özellikleri

4.1.1 Antibiyotik Hassasiyeti

Bir suşun, yaygın olarak kullanılan çeşitli klinik antibiyotiklere direnç özelliği taşıması ve bu direnç genlerini farklı mikroorganizmalara aktarmaması suşlardan probiyotik ve starter kültür olarak yararlanım potansiyeli için aranan bir özelliktir. MA suşlarının çeşitli ticari antibiyotiklere karşı direnç özellikleri disk difüzyon metoduna göre saptanmış ve bu antibiyotiklerin etki mekanizmaları Çizelge 2.2'de verilmiştir. Deney sonuçları CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE) 2012'ye göre inhibisyon zon çapı değerleri 20 mm'den büyük olan laktik asit bakterileri kullanılan antibiyotiklere karşı duyarlı, 14-19 mm arası orta seviyede dirençli ve 14 mm'den küçük olanlar dirençli olarak değerlendirilmiştir. Laktik asit bakterilerinin CLSI standartlarına göre antibiyotik direnç verileri Çizelge 4.1'de, inhibisyon zon çapı sayısal değerleri ise EK.B' de verilmiştir. Elde edilen verilere göre *L. gasseri* MA suşlarının tamamı Amikasin, Gentamisin, Kanamisin, Nalidiksik Asit, Ofloksasin antibiyotiklerine karşı direnç, Amoksisilin, Ampisilin, Kloksasilin, Eritromisin, Penisilin G antibiyotiklerine karşı hassasiyet göstermiştir. En yüksek hassasiyet ise Penisilin G, Eritromisin, Amoksisillin antibiyotiklerine karşı gözlenmiştir. Kloramfenikol antibiyotiğine MA-5 suşu orta seviyede direnç gösterirken diğer beş suş hassasiyet göstermiştir.

Martín vd., (2005) anne sütünden izole ettikleri iki adet *L. gasseri* suşunun antibiyotik direnç özelliklerini araştırmış ve suşların siprofloksasin, gentamisin, kanamisin, nalidiksik asit, klindamisine ve sülfametoksazol ile kombine edilmiş trimetoprim'e dirençli fakat ampisilin, amoksisilin, sefalotin, kloramfenikol, eritromisin, penisilin ve tetrasikline duyarlı olduğunu gözlemlemişlerdir.

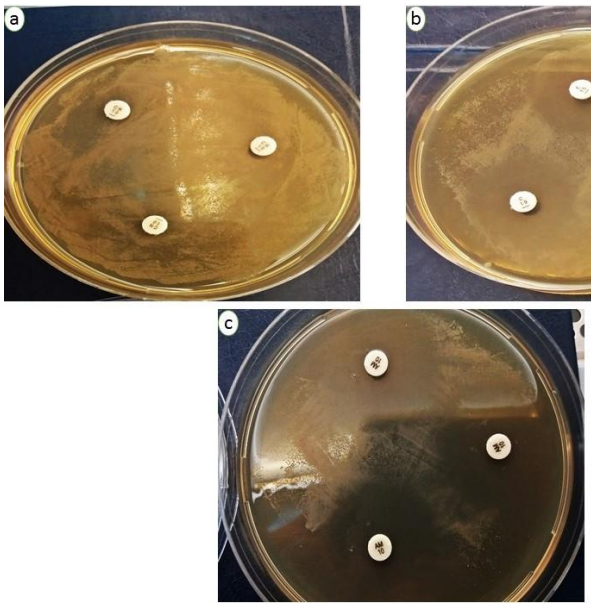
Kim vd., (2006) yapmış oldukları bir çalışmada yeni doğan gaytasından izole ettikleri *L. gasseri* NLRI-312 suşunun çeşitli klinik antibiyotik disklerine direnç özelliklerini

araştırmış ve suşun kanamisin antibiyotiğine direnç, eritromisin, penisilin ve tetrasiklin antibiyotiklerine hassasiyet ve kloramfenikol, vankomisin, streptomisin'e orta düzeyli direnç gösterdiklerini saptamışlardır. *L. gasseri* suşlarının her iki çalışmada ortak olarak kullanılmış olan klinik antibiyotiklere göstermiş oldukları direnç profilleri karşılaştırıldıklarında geçmişte yapılan çalışma verilerinin sonuçlarımız ile benzer olduğu belirlenmiştir. Ancak bu çalışmada farklı olarak kloramfenikol antibiyotiğine yalnızca bir MA suşunun orta seviyeli direnç gösterdiği belirlenmiştir.

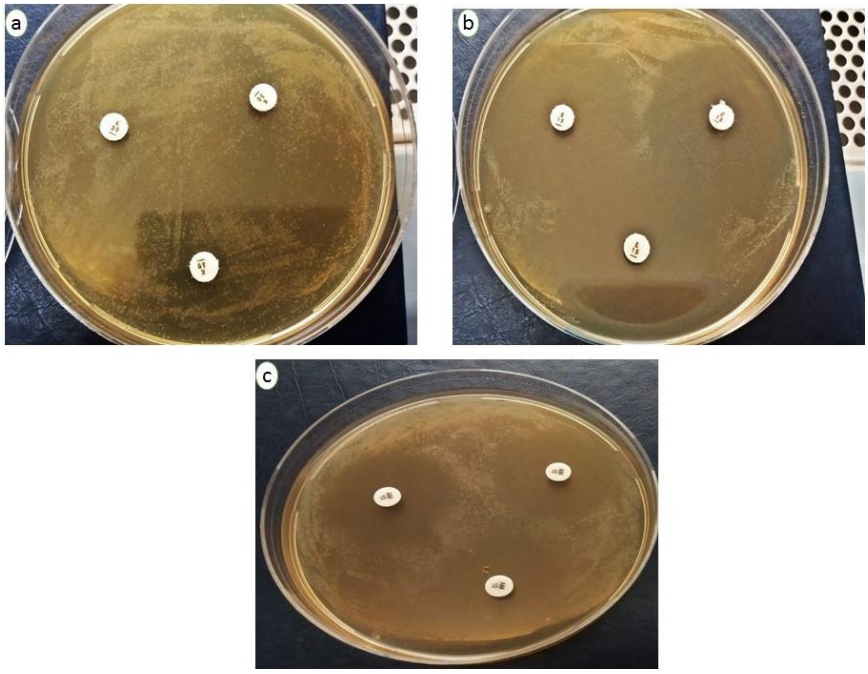
Çizelge 4.1: *L. gasseri* MA suşlarının Antibiyotik Hassasiyetleri (CLSI).

(LAB)	AK	AMC	AM	C	OB	E	CN	K	NA	OFX	P
MA-1	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S
MA-2	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S
MA-3	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S
MA-4	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S
MA-5	R	S	S	IR	S	S	R	R	R	R	S
MA-6	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S

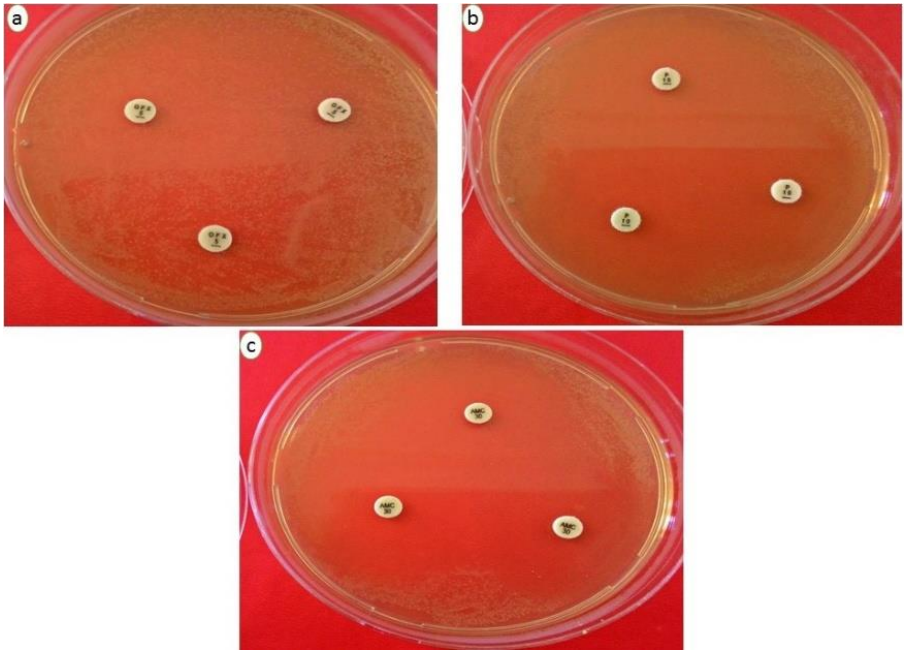
* AK (10µg): amikasin; AMC (30µg): amoksisilin, AM (10µg): ampisilin, C (10µg): kloramfenikol, OB (5µg): kloksasilin, E (15µg): eritromisin, CN (10µg): gentamisin, K (30µg): kanamisin, NA (5µg): nalidiksik asit, OFX (5µg): ofloksasin, P (1µg): penisilin, R: dirençli, IR: orta seviyede dirençli, S: hassas.



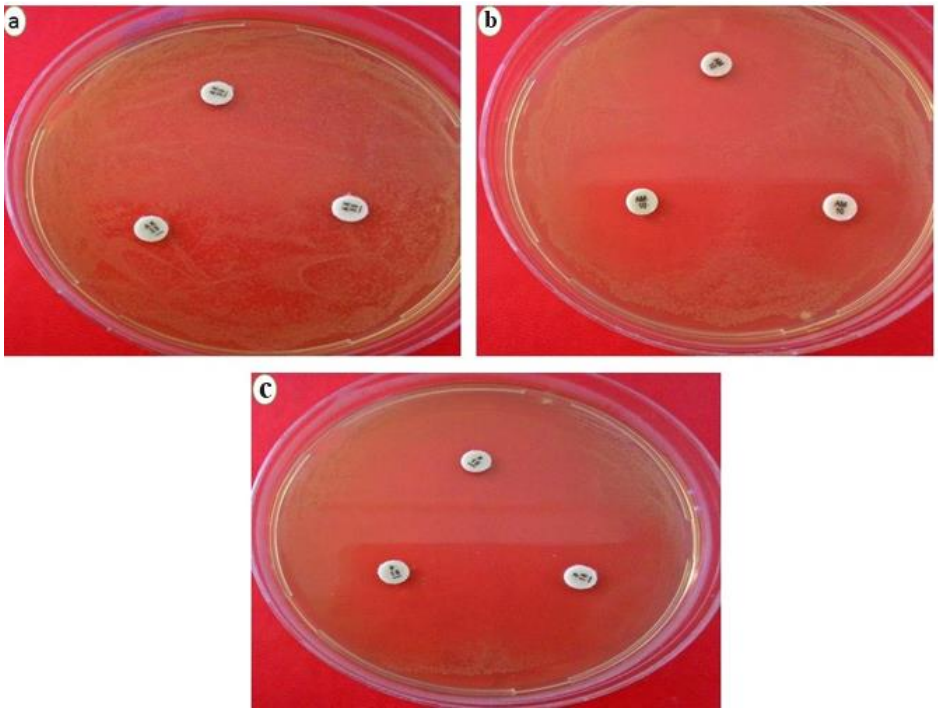
Şekil 4.1: a) MA-1 Gentamisin (10µg) (R), b) MA-1 Kloramfenikol (10µg) (S), c) MA-1 Ampisilin (10µg) (S).



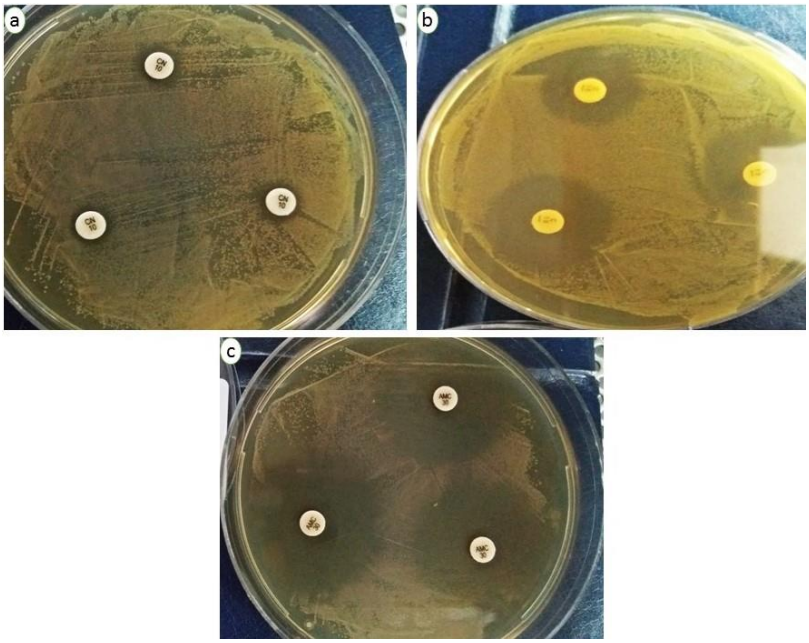
Şekil 4.2: a) MA-2 Kanamisin (30 µg) (R)**,** b)MA-2 Eritromisin (10 µg) (S), c) MA-2 Ampisilin (10µg) (S).



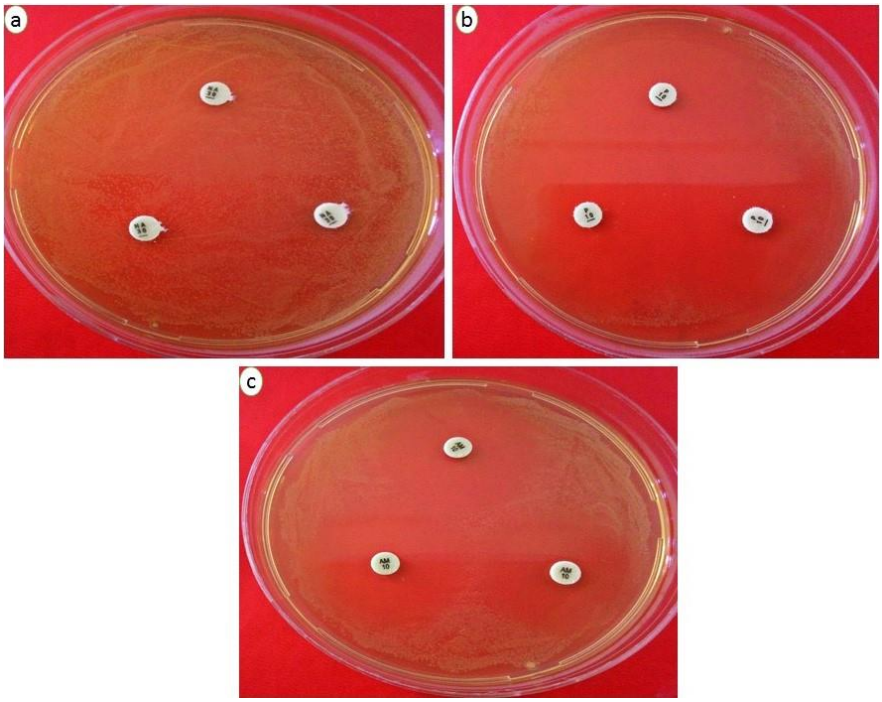
Şekil 4.3: a) MA-3 Ofloksasin (5µg) (R)**,** b)MA-3 Penisilin-G (10µg) (S), c) MA-3 Amoksisilin (30µg) (S).



Şekil 4.4: a) MA-4 Amikasin (30 µg) (R)**,** b) MA-4 Ampisilin (10µg) (S), c) MA-4 Penisilin-G (10µg) (S).



Şekil 4.5: a) MA-5 Gentamisin (10µg) (R), b) MA-5 Kloramfenikol (10µg) (IR), c) MA-5 Amoksisilin (30 µg) (S).



Şekil 4.6: a) MA-6 Nalidiksik Asit (30 µg) (R), b) MA-6 Penisilin-G (10 µg) (S), c) MA-6 Ampisilin (10 µg) (S).

4.1.2 Düşük pH Toleransı

Probiyotik kültürler konakçı tarafından tüketilmesinin ardından, gastro intestinal sistemde ilerleyişi boyunca oldukça farklı çevresel koşullarla karşı karşıya gelirler. Boş midenin pH'sı 1.5 olmasına rağmen, tüketilen besinlerin 90 dakikalık sindirimi boyunca mide pH'sı 3'e kadar yükselebilir. Bu nedenle probiyotik olarak karakterize edilecek bir suşun öncelikle midenin düşük pH koşullarına tolerans göstermesi beklenir (Lebeer vd., 2008). MA suşlarının düşük pH değerlerine direnç özellikleri, pH 2 ve 3'e ayarlanan MRS besiyerlerinde kültür edilerek, inkübasyonun farklı saatlerinde (0, 1 ve 3) spektrofotometrik ölçüm (Şekil 4.7) ve katı besiyerinde canlı hücre sayımı (Şekil 4.8) yapılarak test edilmiştir.

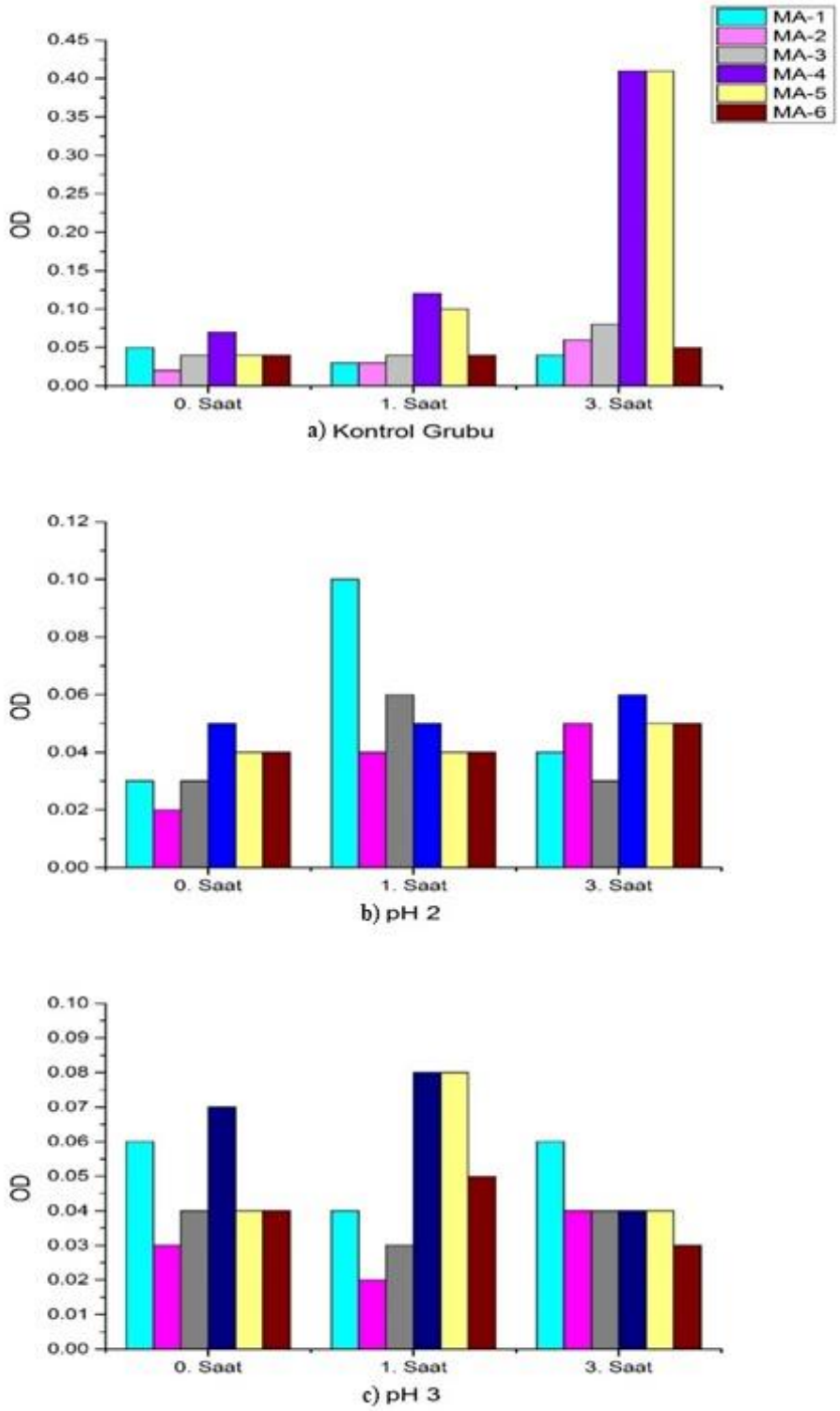
Elde edilen spektrofotometrik verilere göre MA suşlarının tamamının inkübasyonun 0, 1 ve 3. saatlerinde pH 2 ve 3 değerlerine direnç gösterdiği belirlenmiştir. Ancak suşların canlı hücrelere sayıları incelendiğinde, pH 2 değeri için *L. gasseri* MA-3 ve *L. gasseri* MA-6 suşlarının inkübasyonun 1 ve 3. saatlerinde katı besiyerine yapılan ekimlerinde koloni oluşumu gerçekleşmediği tespit edilmiştir. *L. gasseri* MA-1, MA-2, MA-4, MA-5 suşlarının ise her iki pH değerinde de koloni oluşturdukları

belirlenmiştir. Uygulanan iki yöntem arasında gözlenen bu farklılığın, spektrofotometrik ölçüm yapılan sıvı besiyeri ortamında ölüme geçen bakteri hücrelerinin mevcut olması ve bu ölü hücrelerin de OD'sinin hesaba katılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

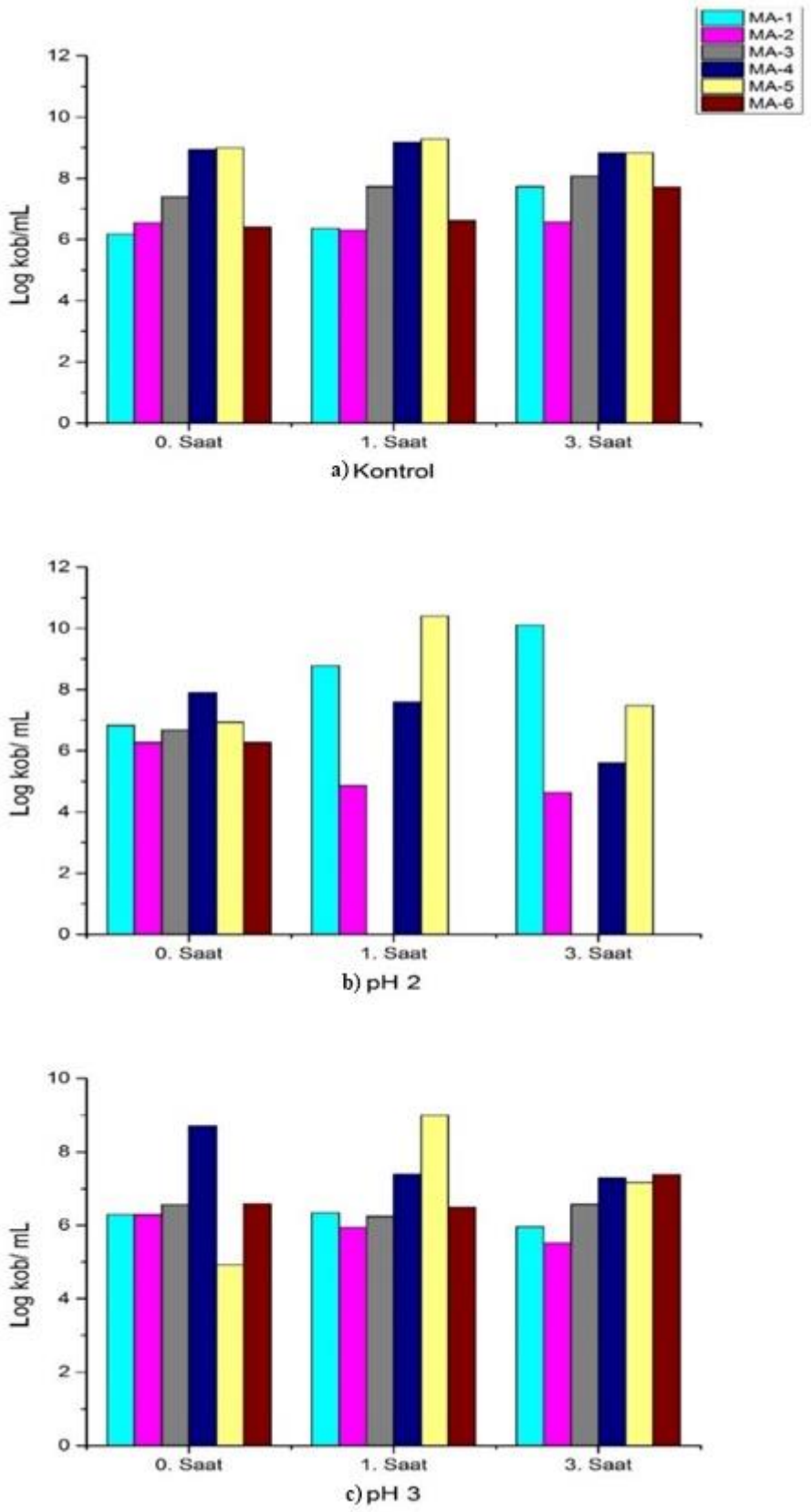
Kim vd., (2006) geçmişte yürüttükleri bir çalışmada yeni doğan feçesinden izole ettikleri *L. gasseri* NLRI-312 suşunun pH 2 değerlerine duyarlılık özelliğini üç adet referans suş (*L. acidophilus, L. acidophilus, L. brevis)* ile karşılatırarak değerlendirmişlerdir. Araştırmanın sonucunda *L. gasseri* suşunun, pH 2 değerine referans suşlara kıyasla daha yüksek tolerans gösterdiği ve inkübasyon süresi boyunca canlılığını sürdürdüğü belirlenmişlerdir.

Geçmişte yapılan bu çalışma ile bizim suşlarımızın pH hassasiyetleri karşılaştırıldığında, *L. gasseri* MA-3 ve MA-6 suşları pH 2 değerinde gelişim gösteremediği ancak diğer dört *L. gasseri* suşunun pH 2 değerini tolere edebildiği belirlenmiştir. Bu durum aynı kaynaktan izole edilen altı *L. gasseri* suşunun birbirinden farklı özellikler taşıdığını göstermektedir.

Tüm bu veriler göz önünde bulundurulduğunda MA-1, MA-2, MA-4, MA-5 suşlarının midede sindirim süresince değişim gösteren pH 2 ve 3 değerlerine toleranslı olduğu, MA-3 ve MA-6 suşlarının pH 2 değerine tolerans gösteremediği ve canlılıklarını tamamen kaybettiği belirlenmiştir.



Şekil 4.7: MA suşlarının pH duyarlılıkları (spektrofotometrik).



Şekil 4.8: MA suşlarının pH duyarlılıkları (canlı hücre Log CFU).

4.1.3 Safra Suyu Toleransı

Midenin asitlik bariyerini aşan suşların bir sonraki aşamada karşılaşacağı safra suyuna tolerans göstermeleri bu suşların probiyotik kültür olarak tanımlanmaları için zorunlu olan bir diğer kriterdir. İnsan gastrointestinal sisteminde safra konsantrasyonu değişmesine rağmen, bu konsantrasyonun ortalama % 0.3 civarında olduğu rapor edilmiştir (Ammor ve Mayo, 2007; Khater vd., 2010). Bu nedenle çalışmada % 0.3 ve % 1 olmak üzere iki ayrı safra konsantrasyonu kullanılmıştır. Laktik asit bakterilerinin spektrofotometrik değerleri Şekil 4.9'da, canlı hücre değerleri ise (Log CFU) Şekil 4.10' da verilmiştir.

Spektrofotometrik verilere göre, % 0.3 safra konsantrasyonunda *L. gasseri* MA-6 suşunun gelişiminde inkübasyonun başlangıç saati ile kıyaslandığında 4. saatinde bir düşüş gösterdiği belirlenmiştir. MA-1 suşunun gelişimi stabil, diğer suşların gelişimi ise başlangıç saati ile kıyaslandığında artış göstermiştir. % 1 oranında safra içeren besiyerinde ise MA-1, MA-2, MA-3, MA-6 suşlarının gelişimin başlangıç canlılık değerine göre düşüş gösterdiği, MA-4 ve MA-5 suşlarında ise artış gözlendiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre safra konsantrasyonu arttıkça MA-1, MA-2, MA-3, MA-6 suşlarının canlılıklarının azaldığı MA-4 ve MA-5 ise safrayı tolere edebildikleri gözlenmiştir.

% 0.3 safra konsantrasyonu için canlı hücre değerleri incelendiğinde MA-3, MA-4, MA-6 suşlarının gelişimlerinde düşüş, MA-1, MA-2 ve MA-5 suşlarının gelişiminde ise başlangıç saatine göre artış gözlenmiştir. % 1 oranında safra konsantasyonu için suşların canlı hücre değerleri incelendiğinde ise, MA-1 suşunun gelişiminde artış gözlenirken diğer suşlar başlangıç ile yaklaşık canlılık değerleri göstermişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre safra konsantrasyonu arttıkça MA-2, MA-3, MA-4, MA-5, MA-6 suşlarının gelişimi yavaşlamış ancak MA-1 suşunun gelişimi her iki konsantrasyonda da artmıştır. Bunun sebebinin MA-1 suşunun daha yüksek safra hidrolaz enzim aktivitesine sahip olabileceğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Spektrofotometrik ve canlı hücre sayım sonuçlarının birbiri ile tam anlamı ile paralellik göstermemesinin yöntem farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

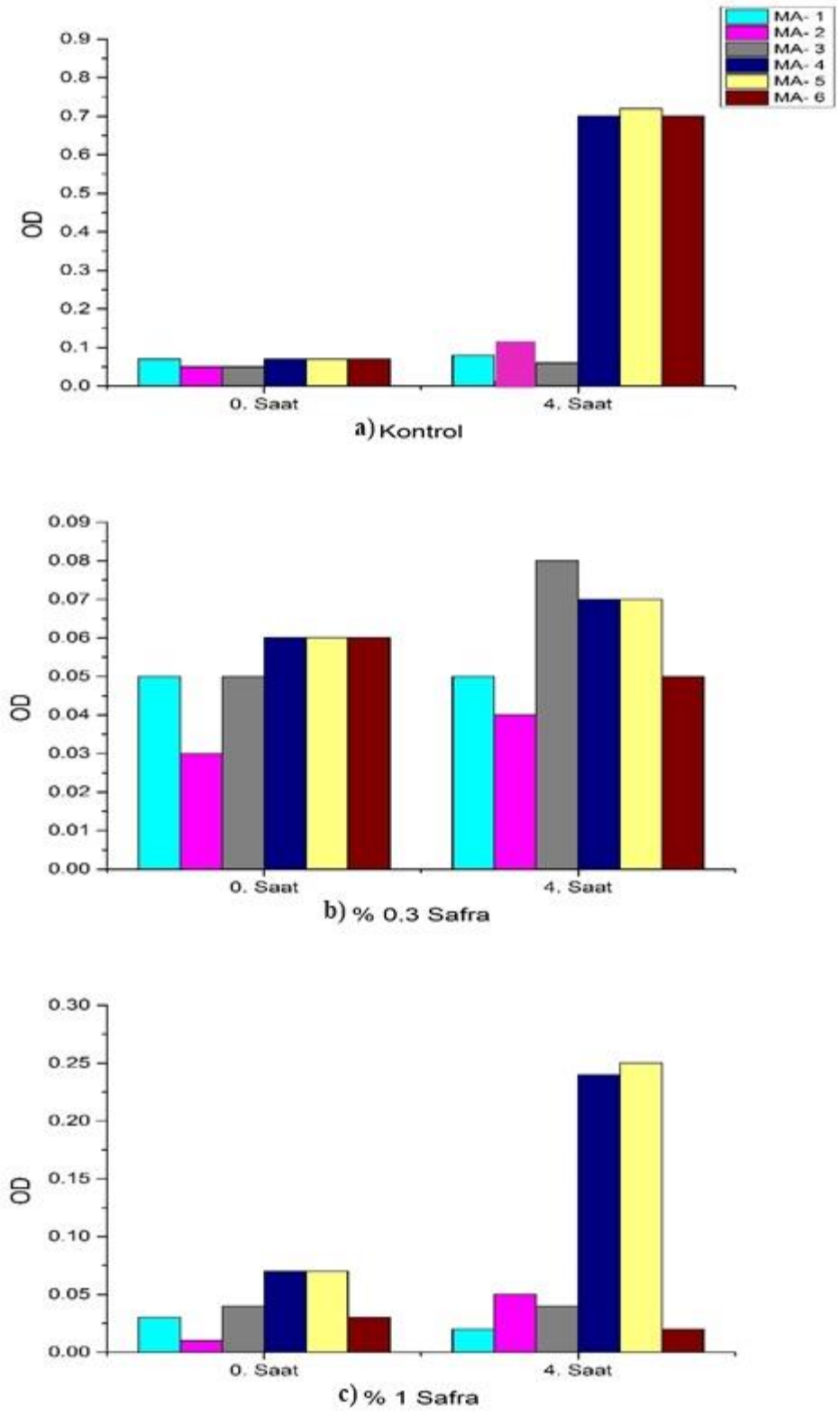
L. gasseri izolatlarının gastro intestinal sistem şartlarına tolerans özelliklerinin belirlenmesi konuşunda literatürde çok kısıtlı çalışma bulunmaktadır. Rodrigues da

Hosono (1999) mandıra sütünden izole ettiği 28 adet *L. gasseri* suşunun % 0.3 konsantrasyonuna sahip besiyerlerinde gelişimlerini spektrofotometrik olarak incelemiştir. İncelenen 28 suşun safraya oldukça farklı derecelerde hassasiyet gösterdikleri belirlenmiştir. İnkübasyon süresi sonunda bazı suşların gelişiminde düşüşler yaşanırken bazı suşların gelişiminde önemli bir değişim gözlememişdir. Bu çalışmada ise farklı olarak farklı safra konsantrasyonu ile çalışılmış ve spektrofotometrik ölçüm yanı sıra canlı hücre sayımı da yapılmıştır. Yapılan spektrofotometrik ölçümlere göre ise, % 0.3 safra konsantasyonunda MA-6 suşunungelişiminde inkübasyonun saati sonunda düşüş, dört suşun gelişiminde artış, MA-1 suşunun gelişiminde ise başlangıç saati ile kıyaslandığında bir fark gözlenmemiştir. Her iki çalışmada da safra toleransı araştırılan suşların, safraya benzer şekilde farklı varyosyonlarda tolerans gösterdiği söylenebilir.

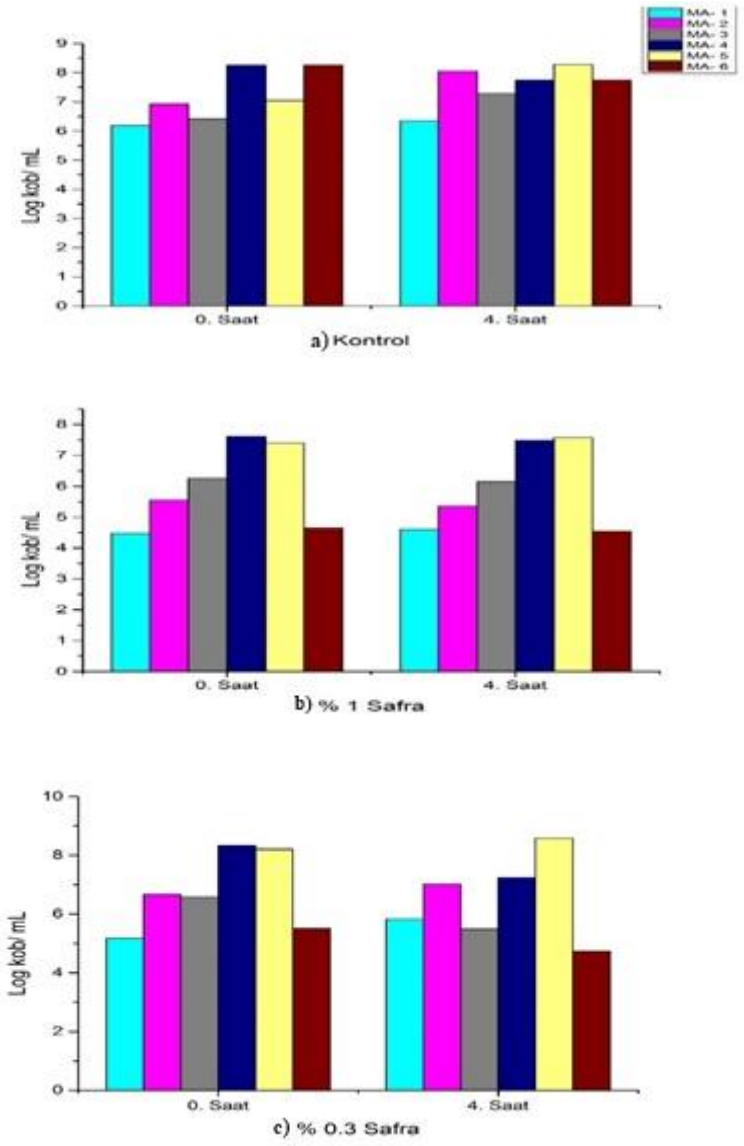
Bir çalışmada Idouı (2012), *L. fermentum* HG3, *L. bulgaricus* HG2, *L. casei ssp casei* HG3, *L. delbrueckii ssp lactis* HG4, *L. gasseri* HG8 suşlarının % 0.3 safra içeren besiyerinde gelişimlerini incelemiştir. Çalışmanın sonucunda en yüksek tolerans *L. fermentum* HG3 suşu için kaydedilmiş ve bu sonucu *L. gasseri* HG8 suşunun takip ettiğini rapor etmiştir.

Rodrigues da Cunha vd., (2012) yaptıkları bir çalışmada anne sütü ile beslenen yeni doğanlardan izole ettikleri *L. gasseri* izolatlarının % 0.25 ve % 0.5 konsantrasyonlarına sahip safraya direç özelliklerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda izolatların çoğunun % 0.25 safraya tolerans gösterdiği ancak, % 0.5 safra konsantrasyonunda izolatların çoğunun gelişimlerinin kısıtlandığını belirlemişlerdir. Bu çalışmada ise daha yüksek safra konsantrasyonları ile çalışılmış olmasına rağmen suşların gelişimin durmadığı, aksine bir suşun gelişiminde artış olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak suşların gelişiminde başlangıç değerine göre bir düşüş olsada bakteri gelişimi hiçbir zaman durmadığı için, safra direnç özelliği araştırılan bu 6 suşun tamamının her iki safra konsantrasyonuna da toleranslı oldukları belirlenmiştir.



Şekil 4.9: MA suşlarının safra duyarlılıkları (Spektrofotometrik).



Şekil 4.10: MA suşlarının safra duyarlılıkları (Log CFU).

4.1.4 Pepsin Toleransı

Midenin düşük pH'ı ve pepsinin antimikrobiyal etkinliği, patojenik özellik taşıyan mikroorganizmaların bağırsak yoluna girişini ve burada kolonize olmasını engelleyen çok önemli bir bariyerdir (Saelim vd., 2012). Bu nedenle besinlerle tüketilen ve gastro intestinal sisteme giriş yapan laktik asit bakterilerinin gastrik sıvıya tolerans göstermesi önemli bir husustur.

L. gasseri MA suşlarının pepsin duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla, pH 2 ve 3 değerlerine sahip pepsin içeren yapay gastrik solüsyonlarda gelişimleri canlı hücre

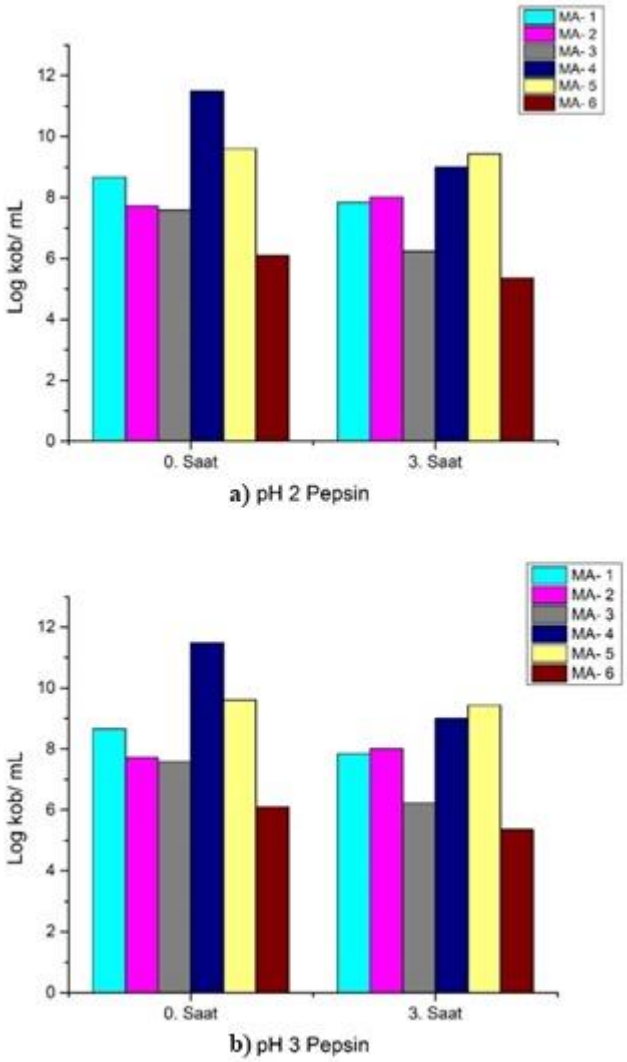
sayımı yapılarak test edilmiştir. Elde edilen verilere göre, pH 3 değerinde hazırlanan gastrik sıvıda MA-3 suşunun canlılık oranı 7.59 log kob/mL'den 6.23 log kob/mL değerine (azalış: 1.36 log/mL), MA-4 suşunun canlılık oranı ise 11.49 log kob/mL'den 9.00 log kob/mL değerine (azalış: 2.49 log/mL) düşüş göstermiştir. MA-2 suşunun canlılık oranı ise 3. saatin sonunda başlangıç inkübasyon saatine göre 0.29 log kob/mL değerinde bir artış göstermiştir. Diğer suşlar için başlangıç canlılık değerlerine göre fazla bir değişim gözlenmemiştir.

Laktik asit bakterilerinin pH 2 değerinde hazırlanan gastrik solüsyonlarındaki canlılık oranları incelendiğinde ise, MA-1 suşu için 9.86 log kob/mL'den 8.19 log kob/mL'ye (azalış: 1.67 log/mL), MA-4 suşu için 11.4 log kob/mL'den 8.86 log kob/mL'ye (azalış: 2.54 log/mL), MA-5 suşu için ise 11.91 log kob/mL'den 9.62 log kob/mL'ye (azalış: 2.29 log/mL) düşüş gözlenmiştir. MA-2, MA-3, MA-6 suşlarının canlı hücre sayılarında ise başlangıç ile kıyaslandığında büyük bir fark gözlenmemiştir.

Geçmişte yürütülen bir çalışmada Fernandez vd., (2003) *L. gasseri* ve *L. acidophilus* suşlarının in vitro koşullarda pH 2 ve pH 3 değerine sahip gastrik sıvıda gelişimlerini incelemişlerdir. Araştırmanın sonunda her iki laktik asit bakterisinin de pH 3 değerinde inkübasyon süresi sonunda canlılıklarında azalma gözlemlemişlerdir. Ancak pH 2 değerinde her iki bakterininde inkübasyon süresi boyunca (90 dakika) canlılıklarını koruduklarını belirlemişlerdir.

Rodrigues da Cunha vd., (2012) ise yaptıkları bir çalışmada anne sütü ile beslenen yeni doğanlardan izole ettikleri 30 adet *L. gasseri* suştan 3 tanesinin pH 2 değerine sahip gastrik solüsyona direnç profilleri incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda bu üç suşun gastrik sıvıya yüksek derecede tolerans gösterebildiği belirlenmiştir.

Bu çalışmada ise, laktik asit bakterilerinin iki farklı pH (2-3) değerine sahip gastrik solüsyonlara tolerans özellikleri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre pH 2 değerinde ayarlanan gastrik solüsyonlarda üç suşun (MA-1, MA-4, MA-5) canlılık oranlarında düşüş olurken, üç suşun canlılık oranlarında başlangıç saatine göre değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Tüm laktik asit bakterilerinin daha asidik olan pH 2 değerindeki gastrik solüsyondaki canlılık oranları pH 3 ile kıyaslandığında bir düşüş göstermiştir. Ancak her iki pH değerine sahip pepsin içeren gastrik solüsyonda da laktik asit bakterilerinin gelişimleri hiçbir zaman durmamıştır. Bu nedenle MA suşlarının tamamının pepsine tolerans gösterebildiği belirlenmiştir.



Şekil 4.11: MA suşlarının pepsin duyarlılıkları (Log CFU).

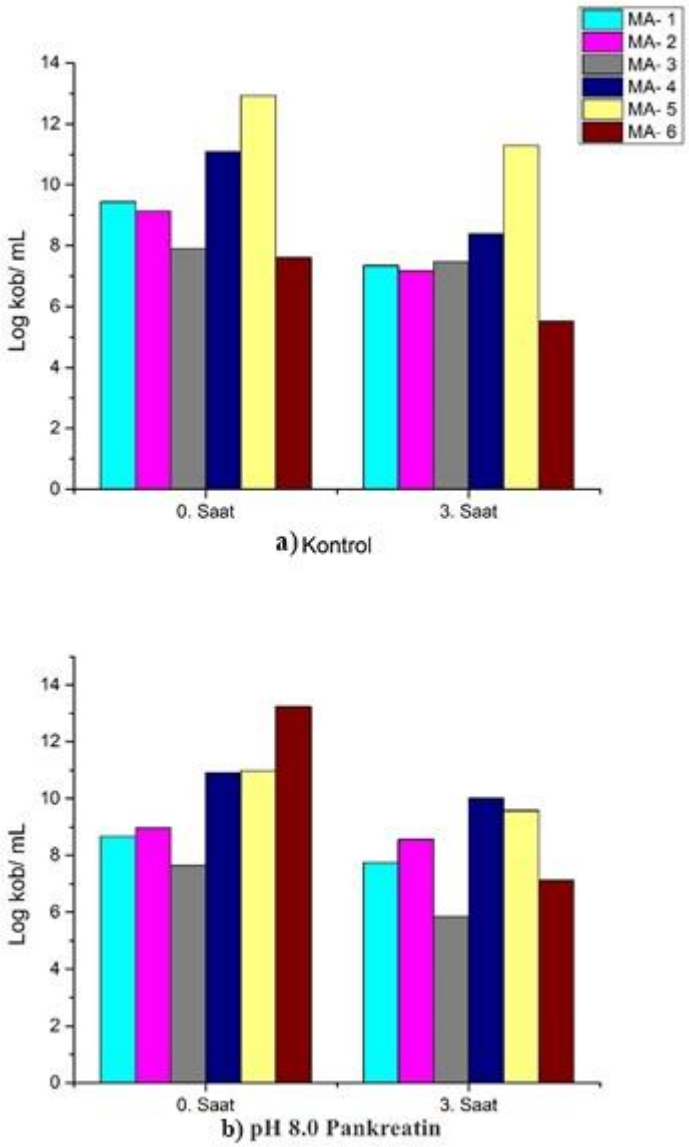
4.1.5 Pankreatin Toleransı

İnsan intestinal sisteminde salgılanan yaklaşık 0.7 lt pankreatik sıvının pH değerinin yaklaşık 7.8-8.0 aralığında olduğu rapor edilmiştir. Gastro intestinal sistemde ilerleyen laktik asit bakterilerinin pankreatik salgılara, pH ve enzimatik bariyerlere karşı tolerans göstermesi gerekmektedir (Charteris vd., 1998). Bu nedenle *L. gasseri* MA suşlarının pH 8.0 değerlerine sahip pankreatik sıvıya özellikleri in vitro koşullarda canlı hücre sayımı yapılarak test edilmiştir (Şekil 4.12).

İnkübasyonun 0. saatinde elde edilen canlı hücre sayıları ile 4. saati sonunda yapılan ekimlerden elde edilen canlı hücre değerleri arasında bir kıyaslama yapıldığında MA-3, MA-6 suşlarının canlılıklarında düşüş belirlenmiştir. MA-2, MA-3, MA-4 ve MA-5 suşlarının canlılık oranlarında çok fazla bir değişim gözlenmemiştir. Şuşlar arasında pankreatik sıvıya en fazla hassasiyet gösteren izolat MA-6 suşu olup, canlılık oranı 13.25 log kob/mL'den 7.12 log kob/mL'ye (azalış: 6.13 log) düşmüştür. Diğer suşların canlılık oranlarında gözlenen azalış değerleri ise, MA-1 suşu için 0.93 log kob/mL, MA-2 suşu için 0.41 log kob/mL, MA-3 suşu için 1.71 log kob/mL, MA-4 suşu için 0.89 log kob/mL, MA-5 suşu için ise 1.39 log kob/mL olarak belirlenmiştir. Bu değerler göz önünde bulundurulduğunda pankreatik sıvıya (bağırsak sıvısı) en yüksek toleransı gösteren suşlar sırasıyla MA-2 ve MA-1 suşları olmuştur.

Geçmişte yapılan bir çalışmada Rodrigues da Cunha vd., (2012) anne sütü ile beslenen yeni doğanlardan izole ettikleri 30 adet *L. gasseri* suştan 3 tanesinin pH 8.0 değerine sahip ince bağırsak (gastrik ve intestinal) sıvılarına tolerans özelliklerini canlı hücre sayımı araştırmışlardır. Araştırmanın sonunda seçilen üç suşun intestinal solüsyonlara yüksek derecede tolerans gösterdiği saptanmıştır. Bu çalışmada ise pankreatik sıvıda geliştirilen iki suşun canlılıklarında (MA-3, MA-6) düşüş olmuş, dört suşun canlılık oranlarında başlangıç saatine göre büyük bir değişiklik olmamıştır. Yapılan iki çalışmada da benzer sonuçlar elde edildiği, suşların pankreatine tolerans gösterebildikleri saptanmıştır.

Tüm laktik asit bakterilerin pankreatik sıvıda canlı hücre oluşturma değerleri incelendiğinde suşların canlılık oranlarında düşüş yaşanmış olsada hiçbir zaman bakteri gelişimi durmadığı için suşların tamamının pankreatine tolerans gösterebildikleri belirlenmiştir.



Şekil 4.12: MA suşlarının pankreatin duyarlılıkları (Log CFU).

4.1.6 Hemolitik Aktivite

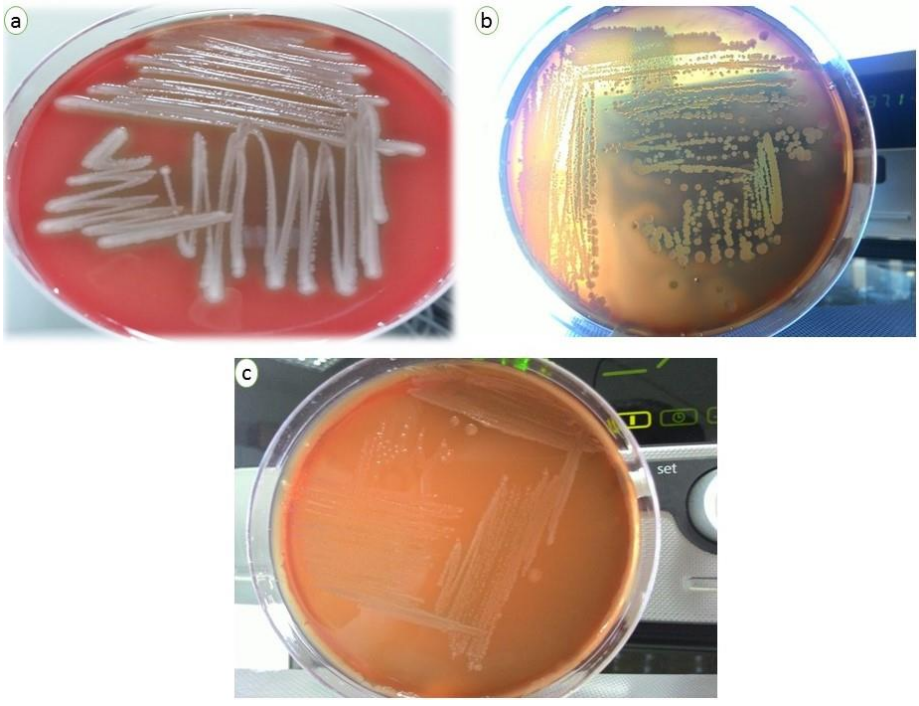
Probiyotik bir kültür olarak karakterize edilen bir şusun gama hemolitik aktiviteye sahip olması, suşun biyoproseslerde kullanımının güvenirliği açısıdan önemli bir in vitro seçim kriteridir. Laktik asit bakterilerinin hemolitik aktivitelerinin belirlenmesinde kontrol grubu olarak *E. coli* ATCC 35218 (α-hemolitik), *S. aureus* ATCC 25923 (beta hemolitik), *E. faecalis* ATCC 29212 (gama hemolitik) üç suş kullanılmıştır. Laktik asit bakteri kolonilerin etrafında yeşil zon oluşumu α-hemolitik, berrak zon oluşumu beta hemolitik, zon oluşumu gözlenmeyen laktik asit bakterileri

gamma hemolitik olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre MA-1, MA-2, MA-3, MA-5 ve MA-6 suşları gamma hemolitik aktiviteye sahipken MA-4 suşunun ise alfa hemolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Rodrigues da Cunha vd., (2012) tarafından geçmişte yapılan bir çalışmada (yeni doğan dışkısından izole edilen 30 adet *L. gasseri'*nin hemolitik aktiviteleri değerlendirilmiş ve suşların tamamının gamma hemolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Owusu-Kwarteng vd., (2015) yapmış oldukları bir çalışmada bazı *L. fermentum* suşlarının hemolitik aktivitesini test etmiştir. Elde edilen sonuçlara göre hiçbir *L. fermentum* suşu β-hemolitik aktivite göstermemiş olmasına rağmen *L. fermentum* 0-25A ve *L. fermentum* 12-18A suşlarının α-hemolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

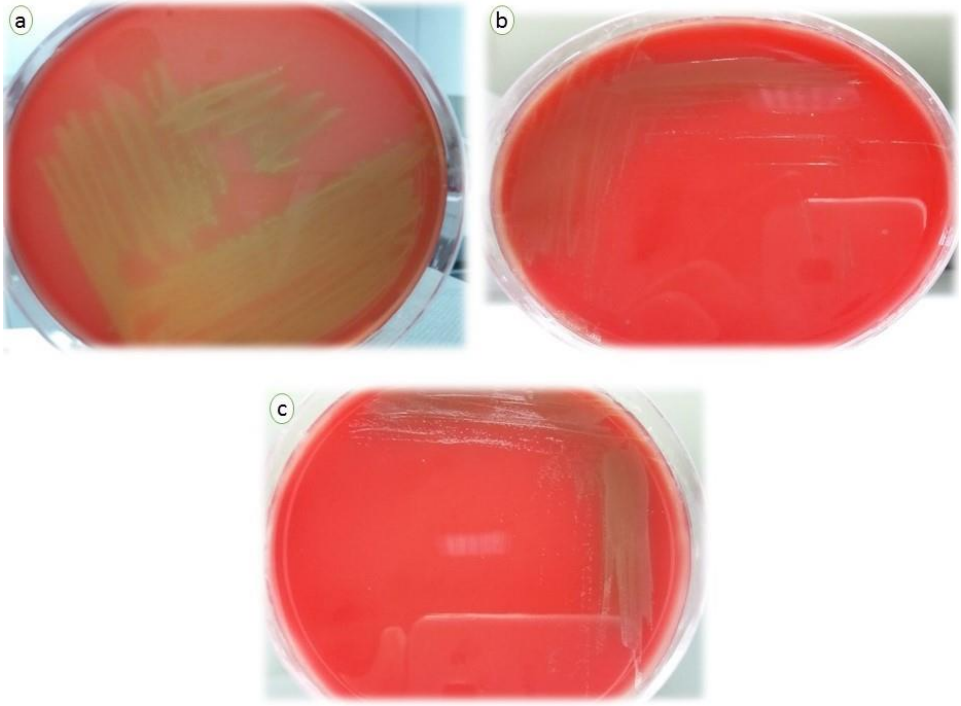
Hütt vd., (2016) yaptıkları bir çalışmada sağlıklı kadındaların vajinal örneklerinden izole edilen *L. gasseri* suşunun hemolitik aktivitesi araştırılmış ve gama hemolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Elde edilen veriler karşılaştırıldığında 5 adet *L. gasseri* MA suşu için paralel sonuçlar (gama hemolitik) elde edilirken, MA-4 suşu için (alfa hemolitik) farklı bir sonuç gözlenmiştir.



Şekil 4.13: a) *E. coli* ATCC 35218 (α-hemolitik), b) *S. aureus* ATCC 25923 (β-hemolitik), c) *E. faecalis* ATCC 29212 (gamma hemolitik).



Şekil 4.14: a) MA-1 (gama-hemolitik), b) MA-2 (gama-hemolitik), c) MA-3 (gama-hemolitik).



Şekil 4.15: a) MA-4 (α-hemolitik), b) MA-5 (gama-hemolitik), c) MA-6 (gama hemolitik).

4.2 MA suşlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri

Laktik asit bakterilerinin bir çok enterik patojenin gelişimini inhibe ettiği ve hem insanlar hem de hayvanlarda görülen gastrointestinal bozuklukları tedavisinde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Fernandez vd., 2003). Bu nedenle probiyotik kültür olarak tanımlanacak bir suşun kolonize olduğu bir habitatta çeşitli antimikrobiyal maddeler salgılayarak, patojen mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmesi beklenmektedir.

Bu nedenle çalışmada *L. gasseri* MA suşlarının süpernatantları çeşitli insan-gıda patojenleri, balık patojenleri ve candida türlerine karşı antimikrobiyal aktiviteleri kuyu difüzyon metodu ile belirlenmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklar etrafında oluşan inhibisyon zon değerleri (r) kaydedilmiş, sonuçlar Çizelge 4.2'de ve sayısal veriler EK.C' de ayrıca verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre MA suşlarının on beş adet insan-gıda patojenlerine karşı göstermiş olduğu antimikrobiyal aktivite 14.29-1.87 mm değer aralığında değişmekte olduğu saptanmıştır. En yüksek antimikrobiyal aktivite MA-2 suşu için *S. epidermidis* ATCC 11228 gıda patojenine karşı (14.29 mm) tespit edilirken, en düşük antimikrobiyal aktivitesi ise MA-5 suşu için *E. faecalis* ATCC 29212 gıda patojenine karşı (1.87 mm) belirlenmiştir.

MA suşlarının yedi adet balık patojenlerine karşı göstermiş oldukları antimikrobiyal aktivite sonuçlarına göre inhibisyon zon çaplarının 11.22-1.66 mm değer aralığında değişmekte olduğu saptanmıştır. En yüksek antimikrobiyal aktivite MA-2 suşu için *A. hydrophila* ATCC 19570 balık patojenine karşı (11.22 mm) tespit edilirken, en düşük antimikrobiyal aktivitesi ise MA-6 suşu için *V. anguillarum* A4 balık patojenine karşı (1.66 mm) belirlenmiştir.

İki adet Candida türü için belirlenen inhibisyon zon çapı değerleri ise 4.80-2.78 mm aralığında değişmektedir. MA-2 suşu *C. albicans* ATCC 10231 patojenine karşı (4.80 mm) tespit edilirken, en düşük antimikrobiyal aktivitesi ise MA-4 suşu için *C. glabrata* patojenine karşı (2.78 mm) belirlenmiştir.

Stoyancheva ve Chorukova (2014) yaptıkları bir çalışmada, sağlıklı bayanlardan alınan vajinal örneklerden izole edilen *L. gasseri* G7 suşunun *E.coli* LMG 8063, *E. fecalis* LMG 7937T, *Enterococus sp*. PO-2 (insan kaynaklı), *S. aureus* LMG 8224, *Candida parapsilosis* (insan kaynaklı) patojen suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitesi

agar spot ve kuyu difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Kuyu difüzyon metodu sonuçlarına göre *L. gasseri* G7 suşu *Escherichia coli* LMG 8063 patojen bakterisine karşı antimikrobiyal aktivite (16 mm) gösterirken, diğer patojen mikroorganizmalara karşı hiçbir aktivite göstermediğini gözlemlemişlerdir.

Ortak olarak çalışılan patojen test mikroorganizmalarına karşı kaydedilen antimikrobiyal aktivite değerleri karşılaştırıldığında, MA-1, MA-4, MA-5 suşlarının *E. coli* ATCC 11229 patojenine, MA-1, MA-3, MA-4, MA-5 suşlarının ise *E. coli* O157:H7 patojen suşuna karşı daha düşük inhibisyon (<8 mm) zon çapı değeri kaydedilmiştir. Ancak bu çalışmada MA-1, MA-3, MA-4, MA-5 suşlarının *S.aureus* ATCC 25923 patojenine karşı, suşların tamamının *C. albicans* ATCC 10231 patojen fungusuna karşı, MA-1, MA-4, MA-5 suşlarının ise *C. glabrata* RSKK 04019 patojen fungusuna karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Luongo vd., (2013) yaptıkları başka bir çalışmada insan intestinal sistemi kaynaklı iki *L. gasseri* (L13-Ia ve OLL2809) suş süpernatantlarının, *Bacillus cereus* DSM 4313, *B. cereus* DMS 4384, *E. coli* DMS 8579 ve *Pseudomonas aeruginosa* patojen suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitesi (disk difüzyon yöntemi ile (5 µl/disk, 10 µL/disk, 20 µl/disk) belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda süpernatant konsantrasyonu arttıkça artan inhibisyon zon değerleri gözlenmiş ve 10 ve 20 µL/disk konsantrasyonları için tüm patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite gözlemişlerdir.

Olivares vd., (2006) yaptıkları bir çalışmada anne sütü kaynaklı iki farklı *L. gasseri* (CECT5714 ve CECT5715) antimikrobiyal aktivitesini *E. coli* O157:H7 CECT4076, *S. aureus* suşları (CECT4013 ve CECT976) ve *L. monocytogenes* Scott A patojen mikroorganizmalarına karşı kuyu difüzyon metodu ile test etmişlerdir. Çalışmanın sonucunda *L. gasseri* CECT5714 suşunun tüm test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivite göstediği, *L. gasseri* CECT5715 suşunun ise yalnızca *S. aureus* suşlarına karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir.

Ortak olarak çalışılan patojen test mikroorganizmalarına karşı kaydedilen antimikrobiyal aktivite değerleri karşılaştırıldığında, MA-1, MA-3, MA-4, MA-5 suşlarının *E. coli* O157:H7 ve *S. aureus* ATCC 25923 patojen suşuna karşı aktivite gösterirken diğer iki suşun aktivite göstermediği belirlenmiştir. Ancak tüm MA suşlarının *L. monocytogenes* ATCC 7644 patojenine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği saptanmıştır.

Yapılan çalışmalara paralel olarak bu çalışmada da aynı kaynaktan (anne sütünden) izole edilmesine rağmen *L. gasseri* MA suşlarının çeşitli salgın hastalıklara neden olan patojen mikroorganizmalar üzerinde farklı derecelerde antimikrobiyal aktivite gösterdikleri belirlenmiştir.

Bu çalışmada literatürdeki çalışmalardan farklı olarak, değişik kaynaklı (insan- gıda patojen bakterileri, balık patojenleri, Candida türleri) patojen mikroorganizmalar kullanıllanılarak *L. gasseri* suşlarının antimikrobiyal aktivitesi geniş çaplı olarak değerlendirilmiştir.

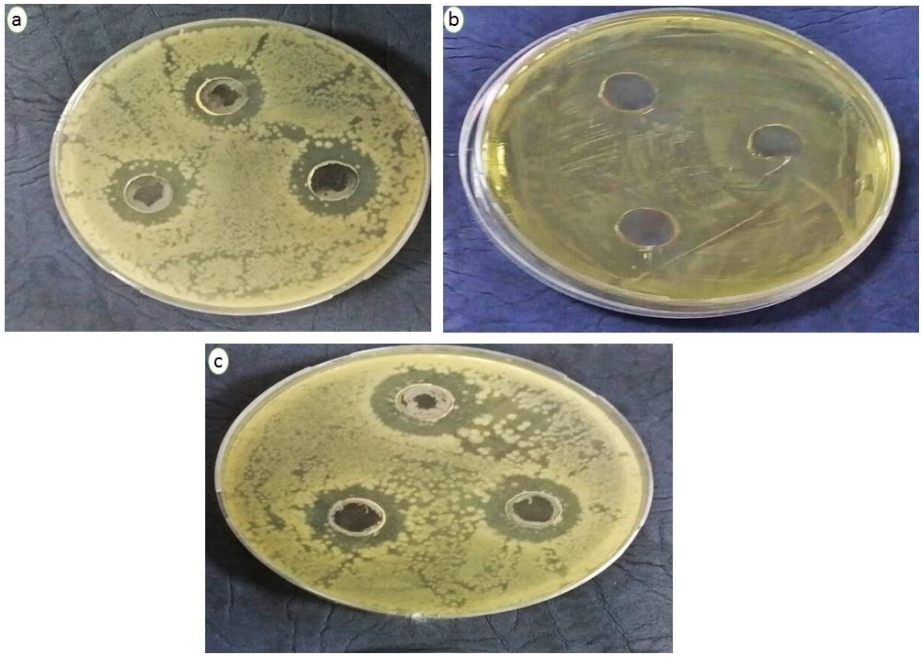
Çizelge 4.2: *L. gasseri* MA suşlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri.

Test Mikroorganizmaları	MA-1	MA-2	MA-3	MA-4	MA-5	MA-6
Escherichia coli ATCC 11229	±	-	-	±	±	-
Escherichia coli O157:H7	±	-	±	±	±	-
Bacillus megaterium (Pasteur Ens.5117)	±	-	-	±	±	-
Salmonella enteritidis RSKK 171	±	±	±	±	±	-
Bacillus cereus RSKK 863	±	-	±	±	±	-
Bacillus subtilis RSKK 244	±	-	±	±	±	-
Escherichia coli ATCC 35218	-	-	-	±	±	-
Micrococcus luteus NRRL B_ 4375	-	±	-	-	-	±
Salmonella enteritidis ATCC 13076	±	±	±	-	±	-
Shigella sonnei MU:57	-	±	-	-	-	-
Staphylococcus aureus ATCC 25923	±	-	±	+	+	-

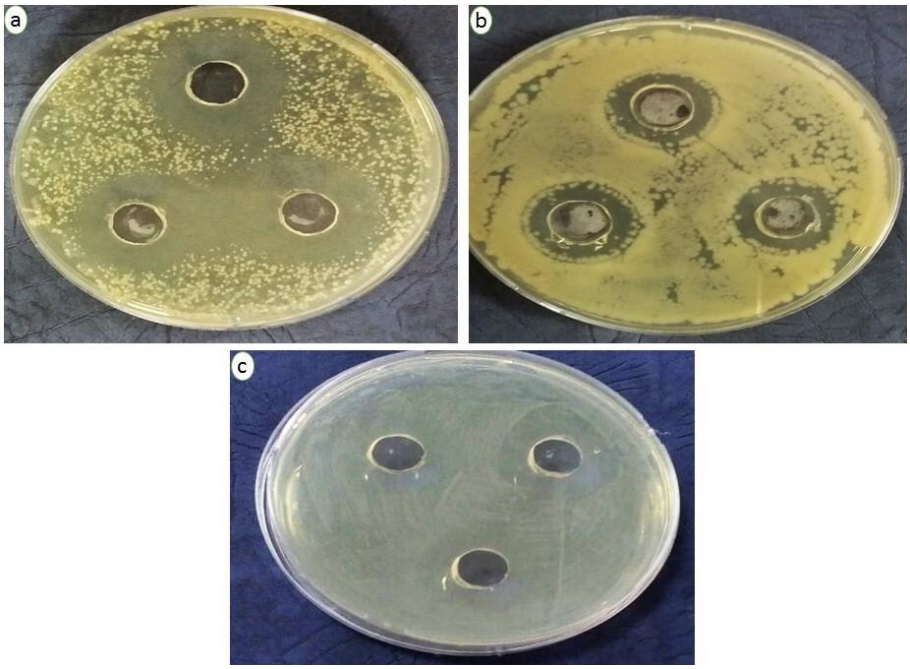
Çizelge 4.2 (devam): *L. gasseri* MA suşlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri.

Yersinia enterocolitica ATCC 11175	±	±	±	±	±	-
Enterococcus faecalis ATCC 29212	±	±	-	±	±	-
Listeria monocytogenes ATCC 7644	++	++	±	±	±	±
Staphylococcus epidermidis ATCC 11228	++	++	++	++	+	++
Vibrio alginolyticus	±	±	±	±	±	±
Vibrio anguillarum M1	±	±	±	±	±	±
Vibrio anguillarum A4	±	±	±	±	±	±
Aeromonas hydrophila ATCC 19570	±	++	++	+	±	±
Lactococcus garvieae	±	±	±	±	±	±
Yersinia ruckeri	-	±	±	±	±	±
Streptococcus agalactiae	±	±	±	±	±	±
Candida albicans ATCC 10231	±	±	±	±	±	±
Candida glabrata RSKK 04019	±	-	-	±	±	-

* Inhibisyon zon çapı değeri yok (-), inhibisyon zon çapı değeri < 8 mm (±), inhibisyon zon çapı değeri 8–10 mm (+), inhibisyon zon çapı değeri > 10 mm (++).



Şekil 4.16: a) MA-1 suşunun *E. coli* O157: H7 patojenine karşı antimikrobiyal aktivitesi (±),b) MA-2 suşunun *V. anguillarum* M1 patojenine karşı antimikrobiyal aktivitesi (±), c) MA-3 suşunun *S. enteritidis* RSKK 171 patojenine karşı antimikrobiyal aktivitesi (±).



Şekil 4.17: a) MA-4 suşunun *S. aureus* ATCC 25923 patojenine karşı antimikrobiyal aktivitesi (+), b) MA-5 suşunun *B. cereus* RSKK863 patojenine karşı antimikrobiyal aktivitesi (±), c) MA-6 suşunun *A. hydrophila* ATCC 19570 patojenine karşı antimikrobiyal aktivitesi (±).

4.3 MA Suşlarının Agregasyon Özellikleri

L. gasseri MA suşlarının oto-agregasyon ve ko-agregasyon yeteneklerinin spektrofotometrik olarak belirlenmiş ve ışık mikroskobu altında gözlenmiştir.

4.3.1 Otoagregasyon Özellikleri

Aynı suşların bir araya gelerek küme oluşturması oto-agregasyon yeteneği olarak belirtilmiştir. Laktik asit bakterilerinin otoagregasyon yeteneğine sahip olması, intestinal sistem epitel hücrelerine yapışması ve bir bariyer oluşturması açısından önemlidir (Kos vd., 2003; Collado vd., 2008). *L. gasseri* MA suşlarının oto-agregasyon yetenekleri % 93-97 arasında kaydedilmiştir. En yüksek değer MA-1 suşu için, en düşük değer ise MA-2 suşu için belirlenmiştir.

Laktik asit bakteri suşlarının % Oto-agregasyon değerleri aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmıştır.

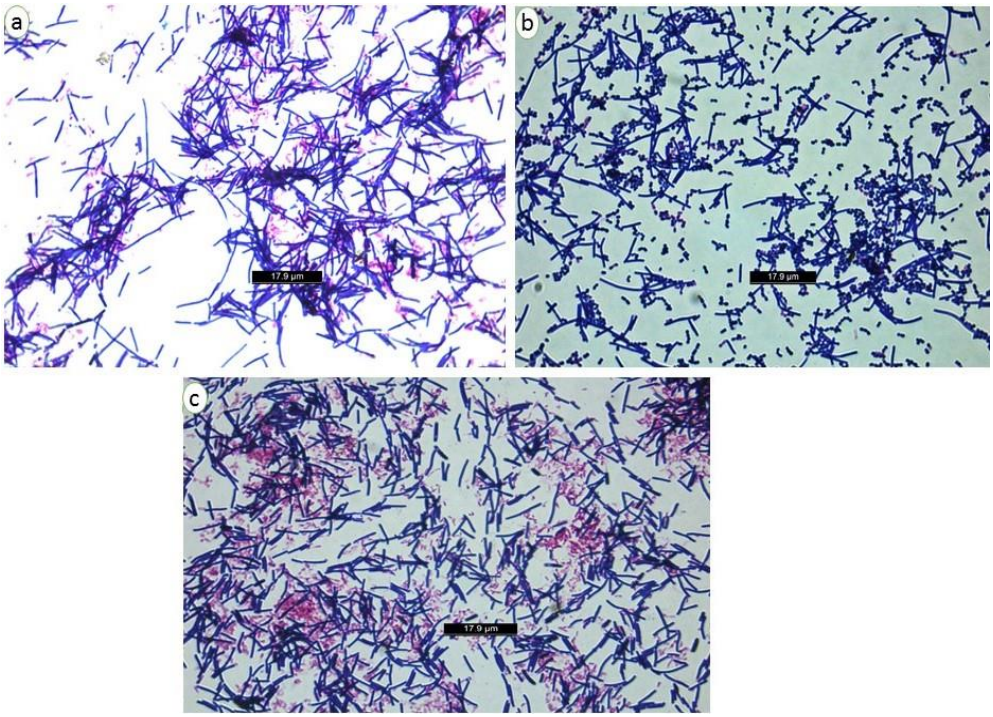
$$\% \text{ Otoagregasyon} = [1-(OD2/OD1)x100]$$

OD1: *L. gasseri* MA suşlarının bekletme öncesi optikal dansitesi

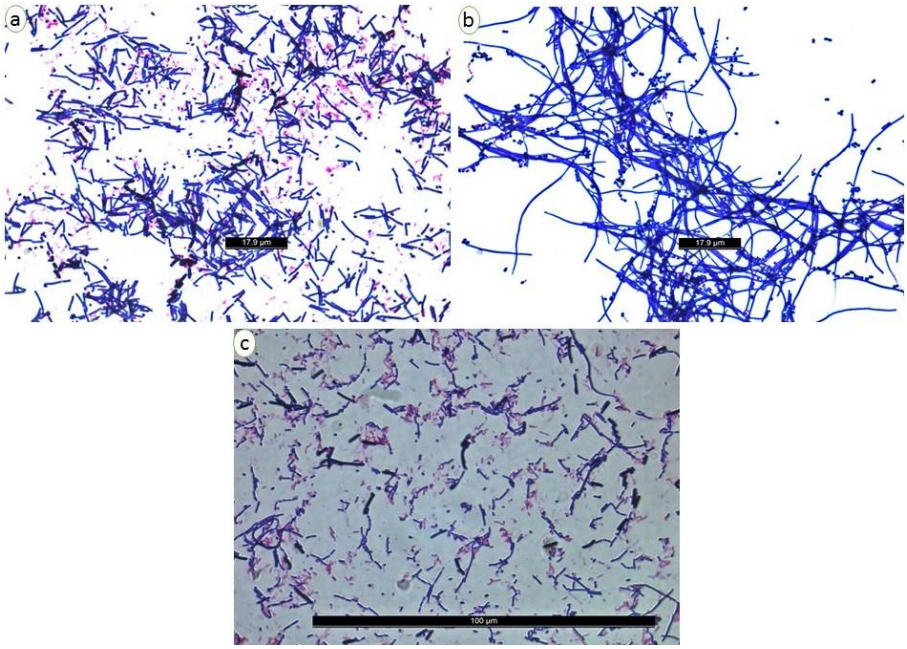
OD2: *L. gasseri* MA suşlarının 4 saatlik bekletme sonrası optikal dansitesi (4.1)

Çizelge 4.3: *L.gasseri* MA suşlarının % otoagregasyon değerleri.

Laktik Asit Bakterileri	% Otoagregasyon
L.gasseri MA-1	97
L.gasseri MA-2	93
L.gasseri MA-3	96
L.gasseri MA-4	95
L.gasseri MA-5	95
L.gasseri MA-6	96



Şekil 4.18: a) MA-1 oto- agregasyon, b) MA-2 oto- agregasyon, c) MA-3 oto-agregasyon (Işık mikroskobu görüntüleri).



Şekil 4.19: a) MA-4 oto- agregasyon, b) MA-5 oto- agregasyon, c) MA-6 oto-agregasyon (Işık mikroskobu görüntüleri).

Ramos vd., (2013) yaptıkları bir çalışmada altı adet laktik asit bakterisinin (*L. plantarum* CH3, *L. plantarum* CH41, *L. plantarum* SAU96, *L. brevis* SAU105, *L. brevis* FFC199, *L. fermentum* CH58) otoagregasyon özelliklerini araştırmışlardır. Şuşların yüzde otoagregasyon değerleri % 18.08-61.89 değer aralığında değiştiğini belirlemişlerdir. Bu değerler *L. gasseri* MA suşları ile karşılaştırıldığında tüm MA suşlarının *L. plantarum* CH3, *L. plantarum* CH41, *L. plantarum* SAU96, *L. brevis* SAU105, *L. brevis* FFC199, *L. fermentum* CH58 suşlarından daha yüksek otoagregasyon değerine sahip olduğu belirlenmiştir.

4.3.2 Koagregasyon Özellikleri

Genetik olarak farklı suşların bir araya gelerek kümeleşmesi koagregasyon yeteneği olarak belirtilmiştir. Laktik asit bakterilerinin koagregasyon kabiliyeti, patojen mikroorganizmaların konakçı intestinal sisteminde kolonizasyonunun engellenmesi açısından önemlidir (Tomás vd., 2005). Bu nedenle *L. gasseri* MA suşlarının çeşitli patojen mikroorganizmalarla koagregasyon kabiliyetleri araştırılmıştır.

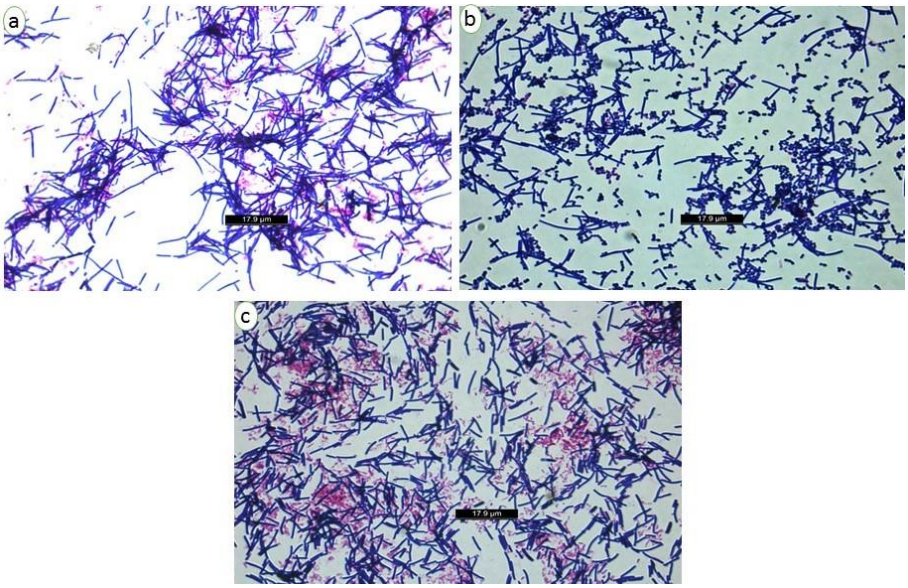
Elde edilen sonuçlara göre *L. gasseri* MA suşlarının çeşitli gıda-insan patojenleri ile koagregasyon yetenekleri % 36-58 değerleri arasında dağılım gösterirken, balık patojenleri ile % 44-51 değer arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir. Suşlarının gıda-insan patojenleri ile tespit edilen en yüksek koagregasyon yüzde değeri (% 58) *E. coli* O157:H7 patojen bakterisi ile MA-3, MA-6 suşları için kaydedilmiştir. En düşük koagregasyon yüzde değeri (% 36) ise *L. monocytogenes* ATCC 7644 ile MA-2 için kaydedilmiştir. *L. gasseri* MA suşlarının balık patojenleri ile göstermiş oldukları en yüksek koagregasyon yüzde değeri (% 51) *S. agalactiae* ve *V. alginolyticus* patojen bakterileri ile MA-1, MA-4 suşları için kaydedilmiştir.

Laktik asit bakterilerinin test grubu olarak belirlenen patojen mikroorganizmalarla koagregasyon değerinin yüzde olarak belirlenmesinde aşağıda belirtilen formüle göre değerlendirilmiştir.

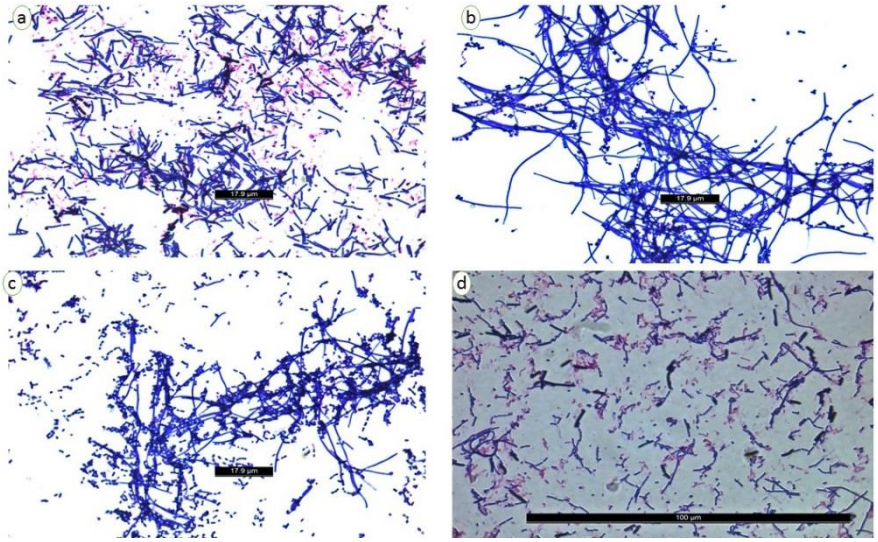
$$\frac{[OD600\ (L.\ gasseri_{\ yalnız} + \text{Patojen Test Mikroorganizması}_{\ yalnız})/2] - OD600\ (L.\ gasseri + \text{Patojen Test Mikroorganizması}_{\ karışık\ kültür})}{OD600\ (L.\ gasseri_{\ yalnız} + \text{Patojen Test Mikroorganizması}_{\ yalnız})/2} \times \%100 \quad (4.2)$$

Çizelge 4.4: *L. gasseri* MA suşlarının % koagregasyon değerleri.

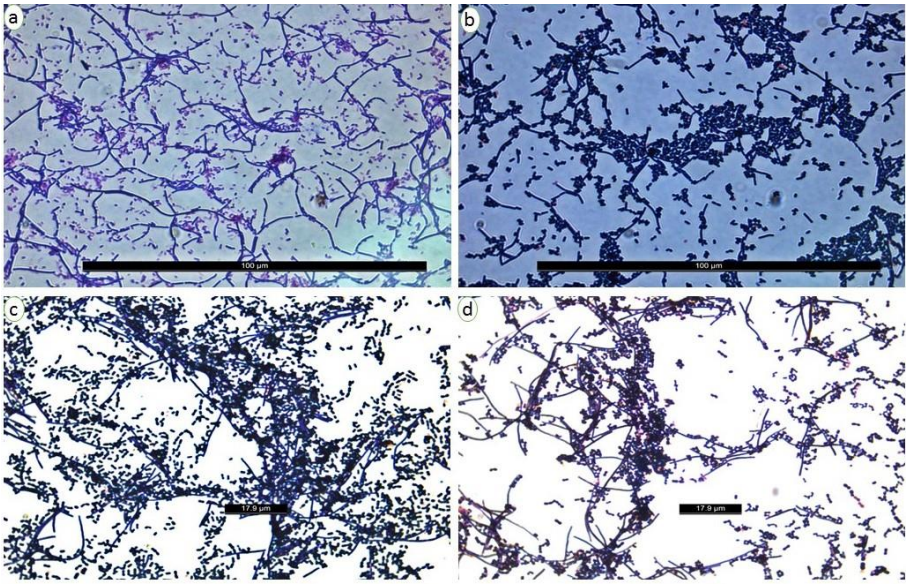
Test mikroorganizmaları	% Koagregasyon					
	MA-1	MA-2	MA-3	MA-4	MA-5	MA-6
L. monocytogenes ATCC 7644	53	36	54	50	52	54
E. coli ATCC 35218	56	39	57	54	56	57
E. coli O157:H7	57	41	58	55	57	58
S. enteritidis ATCC 13076	53	51	53	53	52	46
S. enteritidis ATCC 171	45	43	46	45	44	39
S. agalactiae	51	49	51	51	50	44
V.alginolyticus	51	49	51	51	50	44



Şekil 4.20: a) MA-1ve *S. enteritidis* ATCC 171 koagregasyon, b) MA-1 ve *S. agalactiae* koagregasyon, c) MA-2 ve *S. enteritidis* ATCC 1376 koagregasyon (Işık mikroskobu görüntüleri).



Şekil 4.21: a) MA-3 ve *V. alginolyticus* koagregasyon, b) MA-3 ve *S. agalactiae* koagregasyon, c) MA-3 ve *V. alginolyticus* koagregasyon, d) MA-4 ve *E. coli* O157: H7 koagregasyon (Işık mikroskobu görüntüleri).



Şekil 4.22: a) MA-5 ve *E. coli* ATCC 35218 koagregasyon, b) MA-5 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 koagregasyon, c) MA-6 ve *V. alginolyticus* koagregasyon, d) MA-6 ve *S. agalactiae* koagregasyon (Işık mikroskobu görüntüleri).

4.4 MA Suşlarının Antioksidan Aktiviteleri

Yüksek reaktif oksijen türleri ve serbest radikaller oldukça kararsız maddelerdir ve zamanla doku ve hücrelerde birikerek oksidatif hasarlar ve buna bağlı olarak çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına neden olurlar. Bu nedenle probiyotik mikroorganizmaların reaktif oksijen türlerinin ve serbest radikalleri indirgemesi, etkilerini azaltması konakçı sağlığı üzerinde terapötik etkilerin oluşturulması açısından oldukça önemlidir (Virtanen, 2007).

Bu çalışmada laktik asit bakteri suşlarının antioksidan aktiviteleri DPPH radikalini süpürme ve demir iyonu şelatlama metotları ile tespit edilmiştir. *L. gasseri* MA suşlarının DPPH indirgeme ve demir iyonu şelatlama aktiviteleri Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çalışmada elde edilen verilere göre suşların DPPH radikalini süpürme aktiviteleri % 32.91-54.93 değerleri arasında kaydedilmiştir. Tüm MA suşlarının arasında en yüksek antioksidan aktivite % 54.93 değeri ile MA-5 suşu, en düşük aktivite ise % 32.91 değeri ile MA-1 suşu için kaydedilmiştir.

Suşların demir iyonu şelatlama aktiviteleri ise % 7.73-26.88 değer aralığında kaydedilmiştir. Tüm MA suşlarının arasında en yüksek antioksidan aktivite % 26.88 değeri ile MA-5 suşu için, en düşük aktivite ise % 7.7 değeri ile MA-1 suşu için kaydedilmiştir. MA-6 suşunun ise demir iyonunu şelatlama aktivitesinin olmadığı belirlenmiştir.

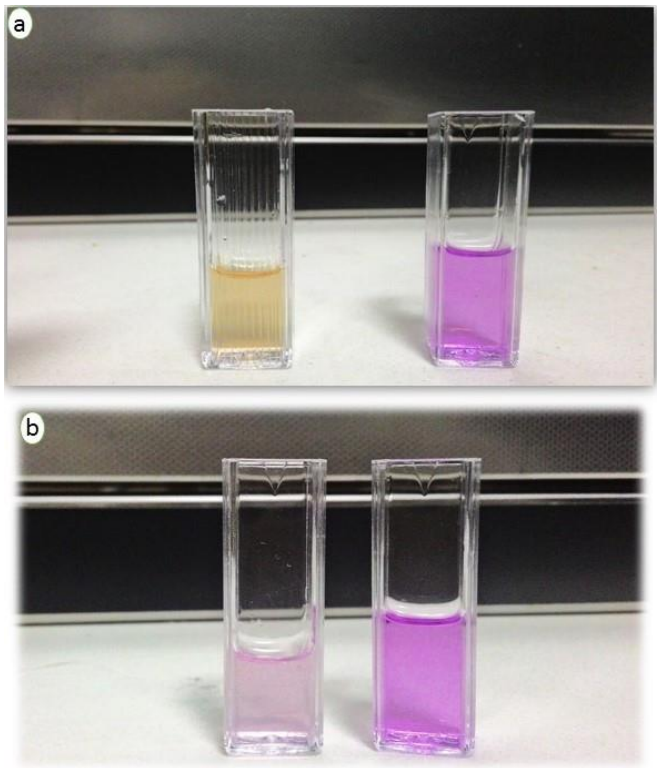
Özdoğan'ın (2011) yaptığı bir çalışmada *L. lactis* subsp LL27 suşunun antioksidan aktivitesi DPPH süpürme kapasitesi ve demir iyonu şelatlama metotları ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *L. lactis* suşunun DPPH süpürme kapasitesi % 75, demir iyonu şelatlama aktivitesi de % 29.5 olarak belirlenmiştir. Başka bir çalışmada (Mendi, 2011) *L. rhamnosus* (yeni doğan gaitası kaynaklı), *L. plantarum* (yeni doğan gaitası), *L. delbrueckii sub sp*. bulgaricus (yoğurt) suşlarının antioksidan aktivitesi DPPH indirgeme ve demir iyonu şelatlama metoduna göre belirlenmiştir. Şuşların DPPH süpürme kapasitesi % 22-56 arasında, demir iyonu şelatlama aktivitesi % 36-70 arasında olduğunu *L. plantarum'*un ise şelatlama aktivitesinin olmadığını belirlemişlerdir.

Belirtilen bu iki çalışmada da olduğu gibi farklı *Lactobacillus* suşlarının antioksidan aktiviteleri literatürde genellikle DPPH indirgeme ve demir iyonu şelatlama metotları ile belirlenmiştir.

Kim vd., (2006) bir çalışmada yeni doğan dışkısından izole edilen *L. gasseri* NLRI-312 suşunun antioksidan aktivitesi linoleik asit peroksidasyon metodu ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre suşun antioksidan aktivitesi % 43.7 olarak belirlenmiştir. Ancak *L. gasseri* suşu ile ilgili sınırlı çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada ise edilen verilere göre her iki metot için ortak bir sonuç olarak tüm *L. gasseri* MA suşlarının arasında en yüksek antioksidan aktivite MA-5 suşu için kaydedilmiştir. Bunun yanı sıra tüm MA suşlarının DPPH serbest radikalini indirgeyebildikleri ve MA-6 suşu hariç demir iyonunu şelatlama aktivitelerinin bulunduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.5: *L. gasseri* MA suşlarının antioksidan aktiviteleri.

LAB	% DPPH radikalini indirgeme	% Demir iyonu Şelatlama
MA-1	32.91	7.73
MA-2	37.11	13.99
MA-3	39.20	10.11
MA-4	39.20	15.60
MA-5	54.93	26.88
MA-6	35.05	-



Şekil 4.23: a) MA-5 şusunun DPPH metodu ile antioksidan aktivitesinin belirlenmesi (sağ tüp kontrol, sol tüp MA-5), b) MA-4 şusunun DPPH metodu ile antioksidan aktivitesinin belirlenmesi (sağ tüp kontrol, sol tüp MA-4).

4.5 MA Suşlarının Alfa Amilaz Enzim Aktiviteleri

L. gasseri MA suşları supernatantları Nutrient agar besiyerine 20 ve 50 µl olmak üzere iki ayrı konsantrasyonda spot ekim yöntemi uygulanarak α-amilaz enzim aktivitesi belirlenmiştir. Spot damlatma yapılan bölgelerde beyaz zon oluşumu α-amilaz pozitif olarak değerlendirilmiş. 20 µl laktik asit bakteri süpernatant spot ekimi ile elde edilen sonuçlara göre MA-4 ve MA-5 suşları alfa amilaz pozitif, 50 µl laktik asit bakteri süpernatantları spot ekimi ile elde edilen sonuçlara göre ise MA-3, MA-4, MA-5, MA-6 suşları alfa amilaz pozitif olarak gözlenmiştir. Elde edilen verilere göre süpernatant konsantrasyonun arttırılması ile alfa amilaz enzim aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Ancak MA-1 ve MA-2 suşlarının da her iki konsantrasyonda da bir aktiviteye rastlanamamıştır.

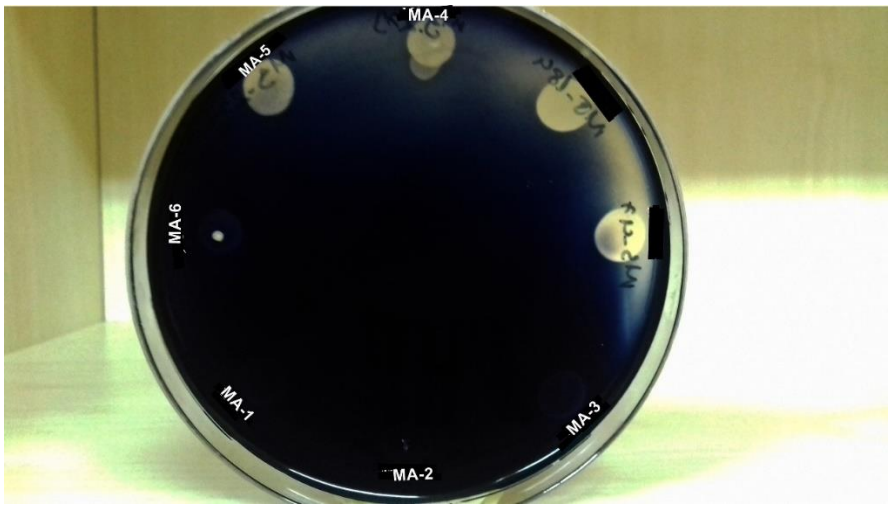
Literatür incelendiğinde *L. gasseri* suşlarının alfa amilaz enzim aktiviteleri ile ilgili bir veriye ulaşılmamakla beraber, farklı *Lactobacillus* suşları ile yürütülen çalışmalar bulunmaktadır.

Rezukoğlu (2011) yapmış olduğu birçalışmada peynir altı suyundan izole edilen PS-2A, PS-3B, PS-3C ve PS-4B laktik asit bakterilerinin alfa amilaz enzim aktiviteleri araştırmış ve PS-2A suşunda aktivite gözlemlemiştir.

Orhan (2013) çiğ sütten izole edilmiş 74 LAB için alfa amilaz enzim varlığı araştırmış ve *Leuconostoc mesenteroides ssp. dextranicum, L. coryniformis subsp. coryniformis* ve *L. plantarum ssp. plantarum, L. casei*, iki *Pediococcus pentosaceus* olmak üzere 6 laktik asit bakterisinde α-amilaz enzim varlığı tespit etmiştir.

Ijeoma vd., (2015) yaptıkları bir çalışmada çeşitli laktik asit bakterilerinin alfa amilaz enzim aktivitesi araştırılmıştır. Araştırma sonucunda *L. curvatus, L. plantarum, L. lactis subsp lactis, L. fermentum* ve *L. plantarum subsp plantarum* suşları için pozitif aktivite gözlenirken, *Weissella cibaria, Enterococcus faecalis, Enterococcus lactis, Leuconostoc pseudomesenteroides, Leuconostoc mesenteroides* ve *L. mesenteroides subsp dextranicum* suşları için herhangi bir aktivite gözlemlenmiştir.

Yapılan bu çalışmalar *Lactobacillus* ve *Lactococcu*s türlerinde alfa amilaz enzim varlığını göstermekte ve çalışmamızda probiyotik özellikleri araştırılan *L. gasseri* MA suşları için araştırmış olduğumuz alfa amilaz enzim aktivite verilerini de desteklemektedir.



Şekil 4.24: Nutrient agar besiyerinde laktik asit bakteri 20 µl süpernatantlarının α-amilaz enzim aktivitesinin gözlemlenmesi.



Şekil 4.25: Nutrient agar besiyerinde laktik asit bakteri 50 µl süpernatantlarının α-amilaz enzim aktivitesinin gözlemlenmesi.

4.6 MA Suşlarının Sodyum Benzoat Direnci

Sodyum benzoat (SB) yiyecek ve içecek endistürilerinde koruyucu olarak kullanılan yapay bir gıda katkı maddesidir (Chen vd., 2009). Bu nedenle SB kimyasal katkı maddesinin gıda bileşiminde doğal olarak bulunan veya sonradan eklenen probiyotik mikroorganizmalar üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

L. gasseri MA suşlarının SB gıda katkı maddesine direnç özellikleri spektrofotometrik ve canlı hücre sayımı ile belirlenmiştir. Bu amaçla % 0.015 ile % 1 aralığında on farklı sodyum benzoat konsantrasyonuna sahip besiyerine ekimi yapılan MA suşlarının OD değerleri spektrofotometrik olarak belirlenmiş ve bu değerler Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Bunun yanı sıra spektrofotometrik ölçüm yapılan her grubun pH değerleri de kaydedilmiş ve bu değerler Çizelge 4.7'de verilmiştir. Elde edilen spektrofotometrik verilere göre, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farklı sodyum benzoat değerlerinde (% 0.075-0.1) sodyum benzoat değerleri hariç) MA suşlarının OD değerlerinde bir düşüş gözlenmiş ancak bu düşüş hiçbir zaman 0.00 değerine ulaşmamıştır. Yine OD değerleri incelendiğinde % 0.075 sodyum benzoat konsantrasyonu için MA-1 ve MA-

3 suşlarının ve % 0.1 sodyum benzoat konsantrasyonu için ise MA-1 ve MA-5 suşlarının gelişimlerini teşvik ettiği gözlemlenmiştir.

Farklı konsantrasyonlara sahip sodyum benzoat içeren besiyerlerinde kültür edilen MA suşlarının pH ölçüm değerleri ise başlangıç pH değerlerine göre düşüş gözlenmiştir. Bu durum laktik asit bakterilerinin farklı konsantrasyonlarda sodyum benzoat gıda katkı maddesini içeren besiyeri ortamında canlılıklarını devam ettirdiğini ve bu süreçte çeşitli organik asitlerin üretilmesi ile başlangıç pH değerlerinin düşmüş ve daha asidik bir ortamın oluşmuş olduğunu göstermiştir. Ancak % 1 konsantrasyonuna sahip sodyum benzoat besiyeri ortamında MA-2 ve MA-3 suşlarının başlangıç pH değerlerine yakın bir değere sahip olduğu belirlenmiştir. Bu değerler spektrofotometrik sonuçlar ile karşılaştırıldığında özellikle MA-3 suşu için, kontol grubuna kıyasla % 1 OD değerinde bir paralellik gözlenmiştir.

% 0.1 sodyum benzoat konsantrasyonu için koloni sayımı sonuçlarının (Çizelge 4.8) logaritmik verileri 10.78-6.85 değer aralığında olduğu tespit edilmiştir. Suşları için koloni sayımı sonuçlarının logaritmik değerleri kontrol grubu ile kıyaslandığında bir düşüş gözlenmiş ancak yalnızca MA-5 suşunun gelişiminin teşvik edildiği ve bu sonucun spektrofotometrik veri ile paralellik gösterdiği gözlenmiştir. % 0.1 sodyum benzoat konsantrasyonu için ise spektrofotometrik veriler ile gelişimi teşvik edildiği gözlenen MA-1 suşunun koloni sayım sonuçları ise kontrol grubuna göre daha düşük olarak gözlenmiştir.

Literatürde *L. gasseri* suşlarının sodyum benzaot direnç özellikleri ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.

Ancak Gümüştekin (2010) yapmış olduğu bir çalışmada *L. acidophilus* suşunun 0.05-90 mg/mL değer aralığındaki farklı konsantrasyonlarda kullanıldığı sodyum benzaoata karşı direnç özelliğini araştırmıştır. Çalışmanın sonunda 0.05 mg/mL sodyum benzoat içeren besiyeri ortamında kültür edilen *L. acidophilus* suşunun OD değerinde kontrol grubu ile kıyaslandığında bir artış gözlenmiş ve artış canlı hücre sayımı ile de onaylanmıştır. Ancak bunun dışındaki konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre *L. acidophilus* suşunun canlılık oranında sodyum benzoat konsantrasyonu arttıkça bir azalma gözlenmiştir.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar literatürdeki sonuçlar ile paralellik göstermektedir. Tüm bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda tüm MA suşlarının farklı konsantrasyonlara ve özellikle yasal olarak kullanımına izin verilen en yüksek

konsantrasyon olan % 0.1 değerine sahip sodyum benzoat gıda katkı maddesine direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.6: MA Suşlarının sodyum benzoat direnç özellikleri (spektrofotometrik).

Kontrol Grubu	**MA-1**	**MA-2**	**MA-3**	**MA-4**	**MA-5**	**MA-6**
	0.68±0.00	1.54±0.00	1.58±0.00	1.94±0.00	1.88±0.00	1.67±0.00
0.015 mg/mL	0.67±0.14	1.22±0.06	1.08±0.29	1.49±0.28	1.59±0.12	1.58±0.10
0.025 mg/mL	0.47±0.09	0.46±0.03	1.44±0.21	0.58±0.10	1.76±0.03	0.48±0.00
0.050 mg/mL	0.60±0.05	1.51±0.01	0.63±0.05	0.55±0.04	0.59±0.05	0.60±0.06
0.075 mg/mL	1.64±0.16	1.46±0.01	1.62±0.02	1.84±0.07	1.74±0.01	1.28±0.01
0.1 mg/mL	1.74±0.02	1.36±0.00	1.54±0.06	1.76±0.01	1.89±0.02	1.67±0.05
0.2 mg/mL	0.47±0.02	0.53±0.05	0.52±0.00	1.32±0.11	1.28±0.06	1.18±0.21
0.3 mg/mL	0.37±0.00	0.38±0.03	0.42±0.03	0.41±0.04	0.41±0.03	0.40±0.02
0.4 mg/mL	0.26±0.06	0.84±0.07	0.55±0.06	0.57±0.03	0.56±0.05	0.56±0.02
0.5 mg/mL	0.55±0.00	0.38±0.02	0.52±0.82	0.58±0.85	0.54±0.85	0.49±0.59
1 mg/mL	0.49±0.15	0.21±0.06	0.06±0.01	0.54±0.02	0.61±0.02	0.09±0.04

Çizelge 4.7: MA suşlarının 0.1 mg/mL sodyum benzoata direnç özellikleri (Log Kob/mL).

(LAB)	Canlı hücre değerleri	
	Kontrol grubu	**0.1 mg/mL sodyum benzoat**
L. gasseri MA-1	9.52	7.94
L. gasseri MA-2	9.33	6.85
L. gasseri MA-3	8.52	8.12
L. gasseri MA-4	11.85	10.78
L. gasseri MA-5	8.93	10.26
L. gasseri MA-6	8.45	8.28

Çizelge 4.8: *L. gasseri* MA suşlarının sodyum benzoatlı ortamda asit üretme yetenekleri.

% Sodyum benzoat (mg/mL)	**Başlangıç pH**	**MA-1**	**MA-2**	**MA-3**	**MA-4**	**MA-5**	**MA-6**
0.015	5.619	3.8	3.8	3.7	3.7	3.7	3.7
0.025	5.581	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.8
0.050	5.628	3.9	4.0	3.7	3.8	3.8	3.7
0.075	5.638	3.9	4.0	3.9	3.9	4.0	3.9
0.1	5.639	3.9	3.9	3.8	3.8	3.8	3.8
0.2	5.677	4.2	4.4	4.1	3.9	4.1	4.1
0.3	5.605	4.1	4.1	3.9	3.9	3.9	3.9
0.4	5.637	4.3	4.8	4.4	4.3	4.3	4.3
0.5	5.640	4.4	5	4.7	4.5	4.3	4.4
1	5.702	4.9	5.5	5.5	4.7	4.8	4.5

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, anne sütünün streptokoklar, bifidobakteriler ve laktik asit bakterileri dahil olmak üzere bir çok probiyotik bakterilerin sürekli kaynağı olduğu ve bu laktik asit bakterinin patojenik bakterilerin gelişimini besin rekabeti veya bakteriyosinler, organik asitler veya hidrojen peroksit gibi antimikrobiyal bileşikler üretmek suretiyle inhibe ettiği ve bu sayede emzirilen bebekte enfeksiyon sıklığının ve şiddetinin azaltılmasında önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir (Collado vd., 2009). Çalışma kapsamında, geçmişte yürütülen bir proje kapsamında anne sütünden izole edilen laktik asit bakterileri, PCR tabanlı moleküler tanımlama yöntemi ile genetik olarak tanımlanmıştır. Moleküler olarak karakterize edilen altı adet *L. gasseri* (MA) suşunun, probiyotik kültür olarak kullanım potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla düşük pH (2 ve 3) değerlerine, farklı (% 0.3 ve % 1) safra konsantrasyonlarına, yapay mide ve bağırsak sıvılarına karşı direnç özellikleri ve hemolitik aktiviteleri in vitro koşullarda belirlenmiştir. Bunun yanısıra MA suşlarının antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri, agregasyon özellikleri, alfa amilaz enzim aktiviteleri, sodyum benzoat gıda katkı maddesine direnç özellikleri araştırılmıştır.

L. gasseri MA suşlarının probiyotik özelliklerinin belirlenmesi çalışmalarında**,** suşların tamamının Amikasin, Gentamisin, Kanamisin, Nalidiksik Asit, Ofloksasin antibiyotiklerine karşı direnç, Amoksisillin, Ampisilin, Kloksasilin, Eritromisin, Penicslin G antibiyotiklerine karşı hassasiyet gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen bu veriler literatür çalışmaları ile paralellik göstermektedir. MA suşlarının klinik antibiyotiklere karşı direnç göstermesi, suşlardan probiyotik kültür olarak yararlanım potansiyelini arttırmaktadır. Ancak bazı kaynaklar probiyotik veya starter kültür olarak kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin, antibiyotik direnç genlerini diğer laktik asit bakterilerine veya patojenite özelliği taşıyan mikroorganizmalara aktarma potansiyeli taşıdığı bildirilmiştir. Buna rağmen probiyotik mikroorganizmaların genom yapılarında antibiyotik direnç geni ihtiva etmeleri, bu genlerin yatay transfer yoluyla aktarım potansiyeli taşımadıkları sürece yapısal direncin (kromozamal

direnç) kendi başlarına bir güvenlik endişesi oluşturmadığı rapor edilmiştir (Darsanaki vd., 2013).

Birçok *Lactobacillus* suşları da dahil olmak üzere enterik bakteri türler için safra, bakteri hücre membranlarına, proteinlerine ve DNA'ya zararlı olabilecek gastrointestinal sistemde karşılaşılan önemli bir bileşendir. Dolayısıyla probiyotik olarak karakterize edilecek bir suşun GIT'deki safra tolere etme kabiliyeti, bağırsak sistemine ulaşabilmesi ve bu alanda kolonize olup terapötik etkileri gösterebilmesi açısından büyük bir gerekliliktir (Azcarate-Peril vd., 2008). Bunun yanı sıra probiyotik mikroorganizmaların gastrointestinal sistem ortamında işlev görebilmesi ve insan sağlığına faydası olabilmesi için, epitel yüzeylere yapışma, mide pH'sı, pepsin, pankreatin, antibiyotik direnci ve patojen mikroorganizmalara karşı antagonistik aktivite gösterme gibi fonksiyonel gereksinimleri taşıması gerekmektedir (Ramos vd., 2013). Çalışmada laktik asit bakterilerinin düşük pH, safra suyu, pepsin, pankreatin gibi stres faktörlerine karşı direnç özellikleri in vitro koşullarda incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre suşların tamamının pH 3 değerinde canlı hücre oluşumları devam etmiş olmasına rağmen, daha asidik pH 2 değeri için *L. gasseri* MA-3 ve *L. gasseri* MA-6 suşlarının katı besiyerine yapılan ekimlerinde koloni oluşturmadığı belirlenmiştir.

Bunun yanı sıra safra, pepsin ve pankreatin içeren solüsyonlarda bazı suşların canlılıklarında bir miktar düşüş yaşansa da gelişim hiçbir zaman durmadığı için tüm laktik asit bakterilerinin safra, pepsin ve pankreatine tolerans gösterebildikleri belirlenmiştir. Bu sonuç MA suşlarının gastrointestinal sistemdeki düşük pH (pH 2 için MA-3, MA-6 hariç), safra, pepsin ve pankreatin bariyerini aşarak, bağırsak mukozal yüzeylerinde kolonize olabileceklerini ve probiyotik kültür olarak yararlanım potansiyeli taşıdıklarını göstermektedir.

Suşlarının oto-agregasyon yeteneklerinin % 93-97 koagregasyon yeteneklerinin ise % 36-58 değerler arasında dağılım göstermekte olduğu belirlenmiştir. MA suşlarının otoagregasyon yüzdelerinin oldukça yüksek olması suşların, gastrik ve intestinal sıvıların oluşturdukları pH ve enzimatik stresi tolere ettikten sonra, bağırsaklarda kolonize olarak güçlü bir bariyer oluşturması ve bu sayede patojen mikroorganizmaların bu alanlarda kolonize olmalarını önlemeleri açısından oldukça önemlidir.

MA suşlarının hemolitik aktiviteleri incelendiğinde MA-1, MA-2, MA-3, MA-5 ve MA-6 suşları gamma hemolitik aktiviteye sahipken MA-4 suşunun ise alfa hemolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Hemoliz, patojenler arasında ortak bir virülans faktörüdür ve patojen mikroorganizmanın demir bulunabilirliğini kolaylaştırır ve alfa ya da beta hemolitik aktivite konakçıda anemi ve ödem oluşumuna neden olur. Laktobasillerde, sınırlı veya belirli nükleotid kaynaklarının bulunduğu bir ortamda veya hidrojen peroksitin güçlü bir üretiminden dolayı, pirimidin ve pürin metabolizması demir ihtiyacı doğabilir ve bu durumda alfa hemolitik aktivite gözlenebilir. Ancak probiyotik olarak karakterize edilen bir suşun suş güvenliği açısından gamma hemolitik aktiviteye sahip olması gerekmektedir (Vesterlund vd., 2007). MA-1, MA-2, MA-3, MA-5 ve MA-6 suşları gamma hemolitik aktiviteye sahip olması suşların güvenilir suş olarak karakterize edilmesi ve probiyotik kültür olarak önerilmesinde oldukça önem taşımaktadır.

Probiyotik ve starter suş olma özelliği taşıyan yeni suşların araştırılması özellikle gıda ve farmakoloji endüstrisinde biyokoruma için de büyük önem arz etmektedir. MA suşlarının antimikrobiyal aktivitesi literatürdeki çalışmalardan farklı olarak, değişik kaynaklı (insan- gıda patojen bakterileri, balık patojenleri, Candida türleri) patojen mikroorganizmalar kullanılarak daha geniş çaplı olarak değerlendirilmiştir.

Antimikrobiyal aktivite verileri incelendiğinde, on beş adet insan-gıda patojenlerine karşı göstermiş olduğu antimikrobiyal aktivite 14.29-1.87 mm değer aralığında olduğu belirlenmiştir. Kaydedilen en yüksek inhibisyon zon değerlerinin MA-2 suşu için *S. epidermidis* ATCC 11228 insan-gıda patojeni için olduğu belirlenmiştir. Ancak MA suşlarının coğunluğunun insan-gıda patojenleri arasında özellikle *S. epidermidis* ATCC 11228 bakterisine karşı 10 mm (++) üzerinde bir inhibisyon zon değeri gösterdiği belirlenmiştir (MA-1: 11.03±1.01, MA-2: 14.29±0.47, MA-3: 11.91±0.27, MA-4: 12.79±0.32, MA-6: 12.55±0.46). Takibinde ise *L. monocytogenes* ATCC 7644 (MA-1: 14.19±1.41, MA-2: 10.82±0.97) patojenine karşı 10 mm (++) üzerinde bir inhibisyon zon değeri gözlenmiştir. Bunun yanısıra *S. aureus* ATCC 25923 (MA-5: 9.04±1.05, MA-6: 8.20±0.93) ve *S. epidermidis* ATCC 11228 (MA-5: 8.64±0.40) patojen suşlarına karşı 8-10 mm (+) aralığında inhibisyon zon değeri gözlenmiştir.

MA suşlarının yedi adet balık patojenlerine karşı göstermiş oldukları antimikrobiyal aktivite 11.22-1.66 mm değer aralığında kaydedilmiştir. Kaydedilen en yüksek

inhibisyon zon değerlerinin MA-2 suşu için *A. hydrophila* ATCC 19570 balık patojeni için olduğu belirlenmiştir. Ancak MA suşlarının balık patojenleri arasında bilhassa *A. hydrophila* (MA-2: 11.22±1.11, MA-3: 10.31±1.46) patojenine karşı 10 mm (++) üzerinde bir inhibisyon zon değeri gözlenmiştir. Bunun yanısıra yine *A. hydrophila* ATCC 19570 (MA-4: 8.24±0.70) patojenine karşı 8-10 mm (+) aralığında inhibisyon zon değeri gözlenmiştir. Akua kültürde yaygın ve bilinçsiz bir şekilde kullanılan antibiyotikler dirençli patojen suşların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Ayrıca bu durum balıklarda antibiyotik kalıntıların oluşmasına, bu kalıntıların tüketicilere aktarılmasına ve sonucunda tüketicilerde alerjik reaksiyonlar gibi birçok sağlık sorununa neden olmaktadır (Cháfer-Pericás vd., 2010). Bu nedenle kültür balıkçılığında balık gastrointestinal sistem mikrobiyal florasının ve sucul habitatların mikrobiyal dengesinin sağlanması amacıyla alternatif olarak daha doğal olan ve antimikrobiyal aktiviteye sahip probiyotik kültürler büyük önem taşımaktadır.

Çalışmada Candida türleri için belirlenen inhibisyon zon çapı değerleri ise 4.80-2.78 mm aralığında değişmekte oluğu saptanmıştır. Kaydedilen en yüksek inhibisyon zon değerlerinin MA-2 suşu için, *C. albicans* ATCC 10231 fungusuna karşı olduğu belirlenmiştir. Tüm antimikrobiyal aktivite verileri göz önünde bulundurulduğunda MA suşlarının özellikle yukarıda belirtilen patojen mikroorganizmalara karşı doğal birer antimikrobiyal ajan olarak kullanım potansiyeli taşıdığı belirlenmiştir.

Anormal derecede yüksek reaktif oksijenin dokularda birikmesi sonucu oksidatif stres ve oksidatif hasarlar oluşur. Oldukça kararsız olan ROS'un indirgenememesi durumunda hücre ölümleri, doku hasarları meydana geldiği rapor edilmiştir (Kim vd., 2005). Serbest radikallerin ve reaktif oksijenin besinlerde birikmesi sonucunda gıda bozulmaları meydana gelmektedir. Antioksidan özellik taşıyan maddelerin ROS ve serbest radikalleri indirgemesi ve zararlı etkilerini azaltması veya yok etmesi oldukça kritik bir durumdur. Son yıllardaki çalışmalarda bitki kökenli bileşenlerin antioksidan özellikleri daha çok çalışılsa da çeşitli fonksiyonel özellikleri taşıyan laktik asit bakterilerinin jenerasyon süresinin kısa olması, metabolik aktivitelerinin hızlı olması ve kolay elde edilebilirliği bir avantaj oluşturmaktadır. *L. gasseri* MA suşlarının DPPH radikalini süpürme aktiviteleri % 32.91-54.93, demir iyonu şelatlama aktiviteleri ise % 7.73-26.88 değer aralığında kaydedilmiştir. Tüm MA suşlarının arasında en yüksek antioksidan aktivite her iki metot ile de MA-5 suşu için kaydedilmiştir.

Çalışma kapsamında antimikrobiyal ve antioksidan özellik taşıyan suşların gıdalarda biyo-koruyucu, diyet takviyesi, ürün kalitesinin ve besin değerinin arttırılması (süt ve süt ürünleri, balık ürünleri vs) gibi nedenlerle gıda katkı maddesi, balık yemi katkısı, akuakültür, farmakoloji ve kozmetik gibi alanlarda kullanım potansiyelini oluşturmakta ve bu büyük önem arz etmektedir. Çünkü kimyasal antimikrobiyal ve antioksidan ajanlar geniş ölçüde kullanılmasına rağmen insan sağlığı üzerinde olumsuz birçok etkiye sebebiyet vermekte ve bu hususlarda bilinçlenen tüketicilerin taleplerinin artmasına bağlı olarak doğal antimikrobiyal ve antioksidanların arayışı her geçen gün artarak devam etmektedir.

Endüstriyel enzimlerin en çok kullanıldığı madde nişastadır ve alfa amilaz enzimi nisaştanın α-1,4-glikozidik bağlarını parçalayarak glukozdan gluko-oligosakkaritlere uzanan farklı ürünlerin sentezlenmesini sağlarlar, bu alan endüstride ekonomik büyüklük olarak ikinci sırada yer alır (Durak ve Toker, 2015). Hayvansal ve bitkisel orjinli enzimler ile karşılaştırıldığında mikroorganizmalardan izole edilmiş enzimlerin çok daha stabil ve ucuz olmaları, katalitik aktivitelerinin daha yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha fazla oranlarda elde edilebilir olmaları gibi sebepler sıralanabilmektedir (Kıran vd., 2006). Suşların alfa amilaz enzim aktivite verileri incelendiğinde MA-3, MA-4, MA-5, MA-6 suşları için alfa amilaz enzim aktivitesi gözlenirken, çalışılan her iki konsantrasyon değeri için MA-1 ve MA-2 suşlarında herhangi bir aktivite gözlemlenmemiştir. MA-3, MA-4, MA-5, MA-6 suşlarının alfa amilaz enzim aktiviteleri ilerleyen çalışmalarda moleküler metotlarla da desteklenmesi halinde suşların gıda, kâğıt endüstrisi gibi alanlara kullanılmak üzere önerilebileceği düşünülmektedir. Bu durum MA suşlarına ekonomik öneme sahip ticari birer suş olma özelliği kazandırmasının yanı sıra gıda ve enzim teknolojisinde kullanım potansiyelleri sayesinde biyoteknolojik bir önem kazandıracaktır.

Sodyum benzoat gıda sanayi (marine edilmiş balık, balık sosları, meyve suları, salata sosları, ketçap ve mayonez vb. ürünlerin daha çok maya ve bakterilere karşı korunmasında), ilaç ve kozmetik, endüstrisinde yaygın olarak kullanılan kimyasal koruyuculardan bir tanesidir (Karakahya, 2011; Özdemir vd., 2012). Sodyum benzoatın belirli konsantrasyonlarda olmak şartı ile gıdalarda koruyucu olarak kullanılmasına izin verilmesine rağmen, FAO (Gıda ve Tarım Örgütü) ve WHO (Dünya Sağlık Örgütü) ve sodyum benzoatın çevre ve insan sağlığı üzerindeki etkilerini araştırmaya devam etmektedir (Karakahya ve Koca, 2016). Çalışma

kapsamında MA suşlarının 0.015, 0.025, 0.050, 0.075, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1 mg/mL olmak üzere on farklı sodyum benzoat gıda katkı maddesine karşı direnç özellikleri spektrofotometrik olarak, 0.1 mg/mL konsantrasyonuna sahip sodyum benzoata direnç özellikleri ise canlı koloni sayımı ile belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre tüm suşlar sodyum benzoata karşı direnç göstermiştir. Bu verilerin tespit edilmesi MA suşlarının doğal gıda katkı maddesi olarak kullanımı sırasında bu kimyasal katkı maddesinden olumsuz olarak etkilenme durumunun bilinmesi açısından önem taşımaktadır.

Tüm bu veriler göz önünde bulundurulduğunda en güvenilir besinlerden biri olan anne sütünden izole edilen 6 adet *L. gasseri* MA suşundan 5 tanesinin probiyotik özellik taşıdığı tespit edilmiştir. Alfa hemolitik aktiviteye sahip MA-4 suşunun probiyotik kültür olarak karakterizasyonu mümkün olmasa da, moleküler metotlarla alfa amilaz enzim varlığının onaylanması ve bu enzimin karakterizasyonu halinde suştan bu enzimin izole edilerek endüstriyel amaçlı kullanımının mümkün olabileceği düşünülmektedir. Yapılan bu çalışma verilerinin literatürde anne sütü kaynaklı *L. gasseri* suşlarının probiyotik olarak karakterizasyonu ile ilgili çalışmaların çok sınırlı sayıda bulunması nedeniyle önem arz etmekte olduğu ve daha sonra *L. gasseri* suşu ile yapılacak çalışmalar için ise bir temel oluşturacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abubakr, M. A., Hassan, Z. ve Imdakim, M. M. A., 2012. Antioxidant activity of lactic acid bacteria (LAB) fermented skim milk as determined by 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and ferrous chelating activity (FCA), African Journal of Microbiology Research, 6(34), 6358-6364.

Ammor, M. S. ve Mayo, B., 2007. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update, Meat science, 76(1), 138-146.

Arakawa, K., Kawai, Y., Nishimura, J., Kitazawa, H. ve Saito, T., 2009. Negative effect of divalent metal cations on production of gassericin T, a bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri*, in milk-based media, International dairy journal, 19(10), 612-616.

Arihara, K. ve Itoh, M., 2000.UV-induced *Lactobacillus gasseri* mutants resisting sodium chloride and sodium nitrite for meat fermentation, International journal of food microbiology, 56(2), 227-230.

Arrieta, M. C., Stiemsma, L. T., Amenyogbe, N., Brown, E. M. ve Finlay, B., 2014. The intestinal microbiome in early life: health and disease, Frontiers in immunology, 5, 427.

Arqués, J. L., Rodríguez, E., Langa, S., Landete, J. M., Medina, M., 2015. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: effect on Pathogens, BioMed research international.

Azcarate-Peril, M. A., Altermann, E., Goh, Y. J., Tallon, R., Sanozky-Dawes, R. B., Pfeiler, E. A. ve Miller, M. J., 2008. Analysis of the genome sequence of *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 reveals the molecular basis of an autochthonous intestinal organism, Applied and environmental microbiology, 74(15), 4610-4625.

Bağcı O., 2015. Anne sütü sarılığının gelişiminde, anne sütü mikrobiyal içeriği ve bebek barsak mikrobiyal florasının etkisinin araştırılması ve bu bebeklerde probiyotik tedavisinin sarılık seyrine etkisinin değerlendirilmesi, Yandal Uzmanlık Tezi, Uludağ Üniversitesi, Tıp fakültesi Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Neonatoloji Bilim Dalı, Bursa.

Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Munoz-Quezada, S., Gomez-Llorente, C. ve Gil, A., 2012. Probiotic mechanisms of action, Annals of Nutrition and Metabolizman, 61(2), 160-174.

Campana, R., Federici, S., Ciandrini, E. ve Baffone, W., 2012. Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 on the growth and adhesion/invasion characteristics of human *Campylobacter jejuni*, Current microbiology, 64(4), 371-378.

Cháfer-Pericás, C., Maquieira, A., ve Puchades, R., 2010. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 29(9), 1038-1049.

Chapot-Chartier, M. P. ve Kulakauskas, S., 2014. Cell wall structure and function in lactic acid bacteria, Microbial cell factories, 13(1), 1.

Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L. ve Collins, J. K., 1998. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract, Journal of applied microbiology, 84(5), 759-768.

Chen, Q., Huang, N. N., Huang, J. T., Chen, S., Fan, J., Li, C.ve Xie, F. K., 2009. Sodium benzoate exposure downregulates the expression of tyrosine hydroxylase and dopamine transporter in dopaminergic neuronsin developing zebrafish, Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology, 86(2), 85-91.

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.

Collado, M. C., Delgado, S., Maldonado, A. ve Rodríguez, J. M., 2009. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR, Letters in Applied Microbiology, 48(5), 523-528.

Cunha, L. R. D., 2011. Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus gasseri* isolated from a newborn infant, Doctor Scientiae, Viçosa Minas Gerais, Brasıl.

Darsanakı R. K., Alıabadı M. A.ve Chakoosarı M. M. D., 2013. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria, Scientific Journal of Microbiology, 2: 201-206.

Devirgiliis, C., Zinno, P. vePerozzi, G., 2013. Update on antibiotic resistance in foodborne *Lactobacillus* and *Lactococcus* species, Frontiers in microbiology, 4, 301.

Di Luccia, B., Manzo, N., Baccigalupi, L., Calabrò, V., Crescenzi, E., Ricca, E. ve Pollice, A., 2013. *Lactobacillus gasseri* SF1183 affects intestinal epithelial cell survival and growth, PloS one, 8(7), e69102.

Djadouni, F. ve Kihal, M., 2012. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and the spectrum of their biopeptides against spoiling germs in foods, Brazilian Archives of Biology and Technology, 55(3), 435-444.

Dominguez-Bello, M. G., Blaser, M. J., Ley, R. E. ve Knight, R., 2011. Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing, Gastroenterology, 140(6), 1713-1719.

Durak M. Z. ve Toker Ö. S., 2015. Gıda Biyoteknolojisi ve Biyoproseslerinde Yeni Gelişmeler, EJOSAT: European Journal of Science and Technology, Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi, 2(5).

Eryılmaz T.F., 2011. Vajinal Sekresyondan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerine Ait Bazı Suşların Potansiyel Probiyotik Özelliklerin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.

Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R. ve Rodríguez, J. M., 2013. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease, Pharmacological Research, 69(1), 1-10.

Fernandez, M. F., Boris, S., ve Barbes, C., 2003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract, Journal of Applied Microbiology, 94(3), 449-455.

Fujimura, S., Kato, S., Oda, M., Miyahara, M., Ito, Y., Kimura, K. ve Watanabe, A., 2006. Detection of *Lactobacillus gasseri* OLL2716 strain administered with yogurt drink in gastric mucus layer in humans, Letters in applied microbiology, 43(5), 578-581.

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

Georgiev, K., Georgieva, M., Iliev, I., Peneva, M., Alexandrov, G., 2015. Antiproliferative Effect Of Bulgarian Spring Water Probiotics (Laktera Nature Probiotic®) Against Human Colon Carcinoma Cell Line, World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutıcal Scıences, Volume 4, Issue 06, 130-136.

Ghosh, S., Ringo, E., Selvam, A. D. G., Rahiman, K. M., Sathyan, N., John, N. ve Hatha, A. A. M., 2014. Gut associated lactic acid bacteria isolated from the estuarine fish Mugil cephalus: molecular diversity and antibacterial activities against pathogens, International Journal of Aquaculture, 4.

Grajek, W., Olejnik, A. ve Sip, A., 2005. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods, Acta Bıochımıca Polonıca-Englısh Edıtıon-, 52(3), 665.

Groer, M. W., Luciano, A. A., Dishaw, L. J., Ashmeade, T. L., Miller, E. ve Gilbert, J. A., 2014. Development of the preterm infant gut microbiome: a research priority, Microbiome, 2(1), 1.

Gülgör, G. ve Özçelik, F., 2014. Bakteriyosin Üreten Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Amaçlı Kullanımı, Academic Food Journal/Akademik GIDA, 12(1).

Gümüştekin, Y., 2010.Bazı *Lactobacillus* cinsi bakterilerin sodyum benzoat'a karşı dirençliliklerinin belirlenmesi ve bazı probiyotik özelliklerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Gün, İ., Yılmaz, M., Şahin, H., İnanç, N., Aykut, M., Günay, O. ve Tuna, Ş., 2009. Kayseri Melikgazi Eğitim ve Araştırma Bölgesi'nde 0-36 aylık çocuklarda anne sütü alma durumu, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi, 52: 176-182.

Hamad, E. M., Sato, M., Uzu, K., Yoshida, T., Higashi, S., Kawakami, H. ve Imaizumi, K., 2009. Milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 influences adipocyte size via inhibition of dietary fat absorption in Zucker rats, British journal of nutrition, 101(05), 716-724.

Hamasalim, H. J., 2015. The Impact of Some Widely Probiotic (Iraqi Probiotic) on Health and Performance, Journal of Biosciences and Medicines, 3(08), 25.

Hao, W. L. ve Lee, Y. K., 2004. Microflora of the gastrointestinal tract, Public Health Microbiology: Methods and Protocols, 491-502.

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

Hoque, M. Z., Akter, F., Hossain, K. M., Rahman, M. S. M., Billah, M. M. ve Islam, K. M. D., 2010. Isolation, identification and analysis of probiotic properties of *Lactobacillus* spp. from selective regional yoghurts, World Journal of Dairy & Food Sciences, 5(1), 39-46.

Hütt, P., Lapp, E., Štšepetova, J., Smidt, I., Taelma, H., Borovkova, N. ve Samuel, K., 2016. Characterisation of probiotic properties in human vaginal lactobacilli strains. work is properly cited, Microbial Ecology in Health & Disease, 27: 30484

Idouı, T., 2012. Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Human Gut, The Online Journal of Science and Technology- July 2012, Volume 2, Issue 3.

Ijeoma, I. O., Okerentugba, P. O. Ve Oranusi, N. A., 2015. Biotechnological characterization of lactic acid bacteria isolated from Ogi-a cereal fermented food product, New York Science Journal 2015;8(12)

Jeurink, P. V., Van Bergenhenegouwen, J., Jimenez, E., Knippels, L. M. J., Fernandez, L., Garssen, J. ve Martin, R., 2012. Human milk: a source of more life than we imagine, Beneficial microbes, 4(1), 17-30.

Jiménez, E., Fernández, L., Maldonado, A., Martín, R., Olivares, M., Xaus, J. ve Rodríguez, J. M., 2008. Oral administration of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation, Applied and environmental microbiology, 74(15), 4650-4655.

Kang, J. H., Yun, S. I., Park, M. H., Park, J. H., Jeong, S. Y. ve Park, H. O., 2013. Anti-obesity effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 in high-sucrose diet-induced obese mice, PLoS One, 8(1), e54617.

Karakahya, F., 2011. Tavuk embriyonal gelişimi üzerine gıda katkı maddesi sodyum benzoat'ın embriyotoksik etkilerinin histolojik yönden belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Aydın.

Karakahya, F. ve Koca, Y. B., 2016. Effects of the Food Additive Sodium Benzoate on Developing Chicken Liver, Cumhuriyet Science Journal, 37(2), 85-98.

Kawase, M., He, F., Kubota, A., Miyazawa, K., Yoda, K. ve Hiramatsu, M., 2011. Strain-specific detection by pulsed-field gel electrophoresis of *Lactobacillus gasseri* TMC0356 in human feces after oral administration of these organisms, Microbiology and immunology, 55(8), 589-594.

Khater, K. A. A., Ali, M. A. ve Ahmed, E. A. M., 2010. Effect of encapsulation on some probiotic criteria, J Am Sci, 6(10), 836-845.

Kıran Ö. E., Çömlekçioğlu U., Dostbil N., 2006. Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları, KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi, 9(1), 12-19.

Kim, H. S., Chae, H. S., Jeong, S. G., Ham, J. S., Im, S. K., Ahn, C. N. ve Lee, J. M., 2005. Antioxidant activity of some yogurt starter cultures, Asian-Aust. J. Anim. Sci, 18(2), 255-258.

Kim, H. S., Jeong, S. G., Ham, J. S., Chae, H. S., Lee, J. M. ve Ahn, C. N., 2006. Antioxidative and probiotic properties of *Lactobacillus gasseri* NLRI-312 isolated from Korean infant feces, Asıan Australasıan Journal Of Anımal Scıences, 19(9), 1335.

Kim, J. W. ve Rajagopal, S. N., 2001. Antibacterial activities of *Lactobacillus crispatus* ATCC 33820 and *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323, Journal Of Mıcrobıology-Seoul-, 39(2), 146-148.

Korhonen, J., 2010. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria. Publications of the University of Eastern Finland Dissertations in Forestry and Natural Sciences, Kopijyvä.

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.

Kotikalapudi, B. L., 2009. Characterization and encapsulation of probiotic bacteria using a pea-protein alginate matrix, Master of Science, University of Saskatchewan Saskatoon, Saskatchewan, Canada.

Lara-Villoslada, F., Olivares, M., Sierra, S., Rodríguez, J. M., Boza, J., Xaus, J., 2007. Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk, British Journal of Nutrition, 98(S1), S96-S100.

Lebeer, S., Vanderleyden, J.ve De Keersmaecker, S. C., 2008. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 72(4), 728-764.

Lin, M. ve Chang, F., 2000. Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, Digestive Diseases and Sciences, 45(8), 1617-1622.

Martín, R., Olivares, M., Marín, M. L., Fernández, L., Xaus, J. ve Rodríguez, J. M., 2005. Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk, Journal of Human Lactation, 21(1), 8-17.

Masuda, T., Hidaka, A., Kondo, N., Ura, T. ve Itoh, T., 2005. Intracellular enzyme activities and autolytic properties of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus gasseri*, Food science and technology research, 11(3), 328-331

Mayrhofer, S., Domig, K. J., Mair, C., Zitz, U., Huys, G. ve Kneifel, W., 2008. Comparison of broth microdilution, Etest, and agar disk diffusion methods for antimicrobial susceptibility testing of *Lactobacillus acidophilus* group members, Applied and environmental microbiology, 74(12), 3745-3748

Million, M., Lagier, J. C., Yahav, D. ve Paul, M., 2013. Gut bacterial microbiota and obesity, Clinical Microbiology and Infection, 19(4), 305-313.

Mishra, V., Shah, C., Mokashe, N., Chavan, R., Yadav, H. ve Prajapati, J., 2015. Probiotics as potential antioxidants: a systematic review, Journal of agricultural and food chemistry, 63(14), 3615-3626.

Muhialdin, B. J., Hassan, Z. ve Sadon, S. K., 2011. Biopreservation of food by lactic acid bacteria against spoilage fungi, Annals. Food Science and Technology, 12(1), 45-57.

Nguyen, H. T., Truong, D. H., Kouhoundé, S., Ly, S., Razafindralambo, H. ve Delvigne, F., 2016. Biochemical Engineering Approaches for Increasing Viability and Functionality of Probiotic Bacteria. International journal of molecular sciences, 17(6), 867.

Olivares, M., Díaz-Ropero, M. P., Gómez, N., Lara-Villoslada, F., Sierra, S., Maldonado, J. A. ve Xaus, J., 2006. The consumption of two new probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT 5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT

5711, boosts the immune system of healthy humans, International microbiology, 9(1), 47-52.

Orhan E., 2013. Sütten İzole Edilen Laktik Bakteriler Ve Streptokokların Enzim Aktiviteleri, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Ouwehand, A. C., Isolauri, E., Kirjavainen, P. V. ve Salminen, S. J., 2000. The mucus binding of *Bifidobacterium lactis* Bb12 is enhanced in the presence of *Lactobacillus* GG and *Lact. delbrueckii subsp. bulgaricus*, Letters in Applied Microbiology, 30(1), 10-13.

Owusu-Kwarteng, J., Tano-Debrah, K., Akabanda, F. ve Jespersen, L., 2015. Technological properties and probiotic potential of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from West African fermented millet dough, BMC microbiology, 15(1), 1.

Özdemir, H., Turhan, A. B. ve Arıkoğlu, H., 2012. Potasyum Sorbat, Sodyum Benzoat ve Sodyum Nitrit'in Genotoksik Etkilerinin Araştırılması, Eur J Basic Med Sci, 2(2), 34-40.)

Patel, A. R., Shah, N. P. ve Prajapati, J. B., 2012. Antibiotic resistance profile of lactic acid bacteria and their implications in food chain, World J. Dairy Food Sci, 7(2), 202-211.

Ramos, C. L., Thorsen, L., Schwan, R. F. ve Jespersen, L., 2013. Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products, Food microbiology, 36(1), 22-29.

Rezzukoğlu İ., 2011. Laktik Asit Bakterisinden A-Amilaz İzolasyonu Ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır.

Rodrigues da Cunha, L., Ferreira, C. L. F., Durmaz, E., Goh, Y. J., Sanozky-Dawes, R. ve Klaenhammer, T, 2012. Characterization of *Lactobacillus gasseri* isolates from a breast-fed infant, Gut microbes, 3(1), 15-24.

Rogelj, I., ve Matijašić, B.B., 2006. *Lactobacillus gasseri* LF221 and K7—from isolation to application, Biologia, 61(6), 761-769.

Saelim, K., Sohsomboon, N., Kaewsuwan, S., ve Maneerat, S., 2012. Probiotic properties of *Enterococcus faecium* CE5-1 producing a bacteriocin-like substance and its antagonistic effect against antibiotic-resistant enterococci in vitro, Czech Journal of Animal Science, 57(11), 529-539.

Scott, K. P., Antoine, J. M., Midtvedt, T. ve van Hemert, S., 2015. Manipulating the gut microbiota to maintain health and treat disease, Microbial ecology in health and disease, 26.

Seçkin, A. K., Tosun, H. ve Aritürk, R., 2010. Biyokorumanın Süt Endüstrisinde Kullanım Olanakları, Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 5(3), 36-46.

Selle, K., ve Klaenhammer, T. R., 2013. Genomic and phenotypic evidence for probiotic influences of *Lactobacillus gasseri* on human health, FEMS microbiology reviews, 37(6), 915-935.

Sharma, R. O. H. I. T., Sanodiya, B. S., Bagrodia, D., Pandey, M. U. K. E. S. H. W. A. R., Sharma, A. ve Bisen, P. S., 2012. Efficacy and Potential of Lactic acid bacteria modulating human health, International Journal of Pharma and Bio Sciences, 3(4), 935-948.

Sharma P., Tomar S. K., Sangwan V., Goswami P. ve Singh R., 2016. Antibiotic resistance of *Lactobacillus* sp. isolated from commercial probiotic preparations, Journal of Food Safety, 36(1), 38-51.

Shazali, N., Foo, H. L., Loh, T. C., Choe, D. W. ve Rahim, R. A., 2014. Prevalence of antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from the faeces of broiler chicken in Malaysia, Gut pathogens, 6(1), 1.

Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P. D. S., Spier, M. R., Medeiros, A. B. P., Yamaguishi, C. T., Lindner, J. D. D., Thomaz-Soccol, V., 2010. The potential of probiotics: a review, Food Technology and Biotechnology, 48(4), 413-434.

Soler-Rivas, C., Espín, J. C. ve Wichers, H. J., 2000. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs, Phytochemical Analysis, 11(5), 330-338.

Soto, A., Martín, V., Jiménez, E., Mader, I., Rodríguez, J. M. ve Fernández, L., 2014. Lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk: influence of antibiotherapy and other host and clinical factors, Journal of pediatric gastroenterology and nutrition, 59(1), 78.

Souza, P. M. D., 2010. Application of microbial α-amylase in industry-A review, Brazilian Journal of Microbiology, 41(4), 850-861.

Stoyancheva, G. ve Chorukova, E., 2015. *Lactobacıllus gasserı* G7–A Bacterıocınogenıc Straın Isolated From Vagınal Sample, First National Conference of Biotechnology, volume 100, livre 4, pp. 154-163.

Tandee, K., 2013. Evaluation of potential probiotic *Lactobacillus casei* strains, Doctoral Dissertation, The Unıversıty Of Wısconsın-Madıson.

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, Ankara.

Tomás, J., Wiese, B., ve Nader-Macías, M. E., 2005. Effects of culture conditions on the growth and auto-aggregation ability of vaginal *Lactobacillus johnsonii* CRL 1294, Journal of applied microbiology, 99(6), 1383-1391.

Vélez, M. P., De Keersmaecker, S. C., ve Vanderleyden, J., 2007. Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract, FEMS microbiology letters, 276(2), 140-148.

Vesterlund, S., Vankerckhoven, V., Saxelin, M., Goossens, H., Salminen, S. ve Ouwehand, A. C., 2007. Safety assessment of *Lactobacillu*s strains: presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates, International journal of food microbiology, 116(3), 325-331.

Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S. ve Korhonen, H., 2007. Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria, Journal of applied microbiology, 102(1), 106-115.

Yangilar, F., 2015. Probiyotik Mikroorganizmalarin Biyokoruyucu Özelliği, Uludağ Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi, Cilt 20, Sayı 1, 2015 doi: 10,17482/uujfe.16850.

Yürümez E., 2011. Gayta Örneklerinden İzole Edilen Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Özellikleri, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

Zoral S., 2013. İnsan Kaynaklı *Lactobacillus* Spp Suşlarının Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ahi Evran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Kırşehir.

Zhu, W. M., Liu, W ve Wu, D. Q., 2000. Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* KT7, Journal of applied microbiology, 88(5), 877-886.

Walter, J., 2008. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research, Applied and Environmental Microbiology, 74(16), 4985-4996.

Węgielska, I., ve Sulibursk a, J., 2016. The role of intestinal microbiota in the pathogenesis of metabolic diseases, Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, 15(2), 201-211.

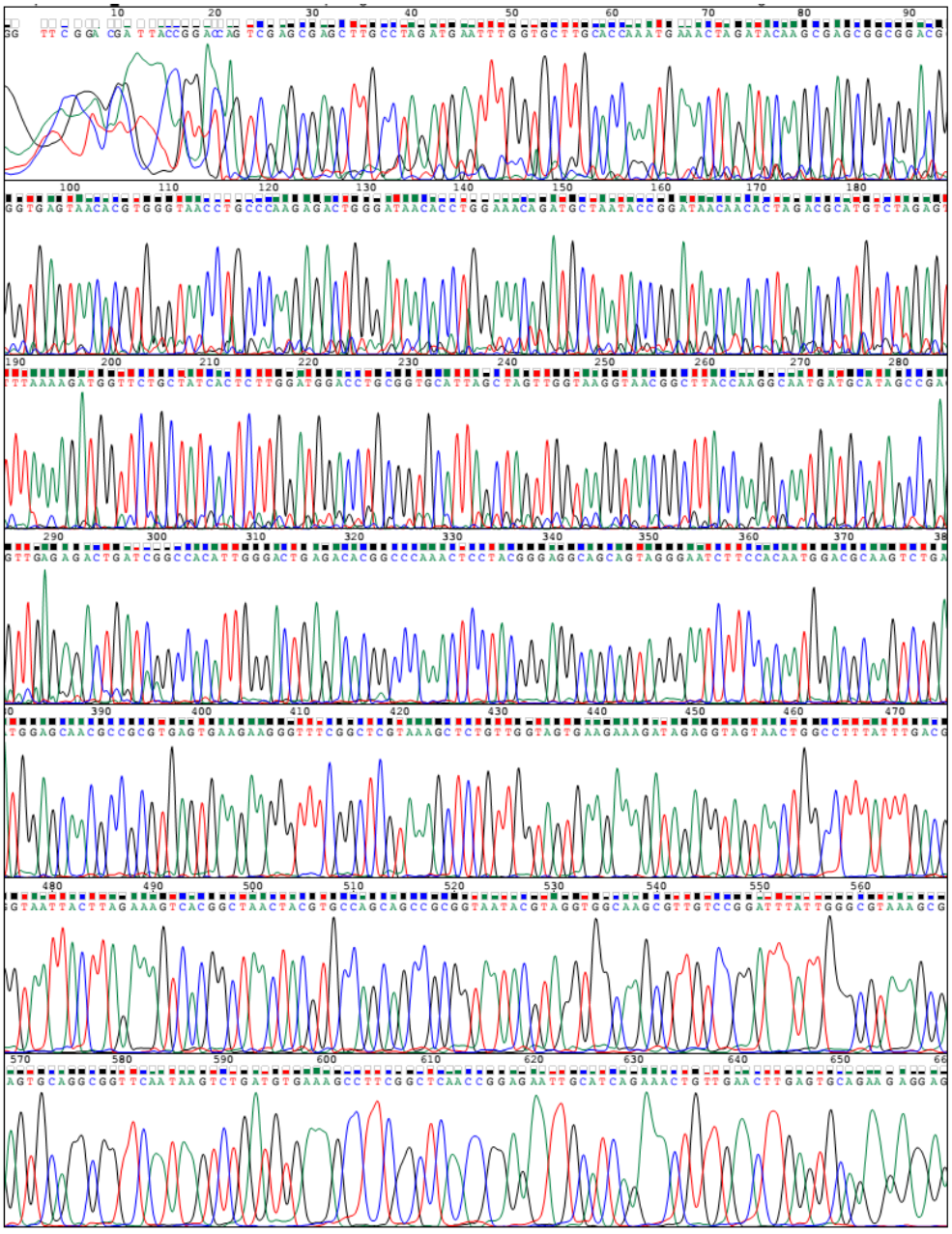
EKLER

EK A: MA suşlarının PCR ile moleküler olarak identifikasyonu

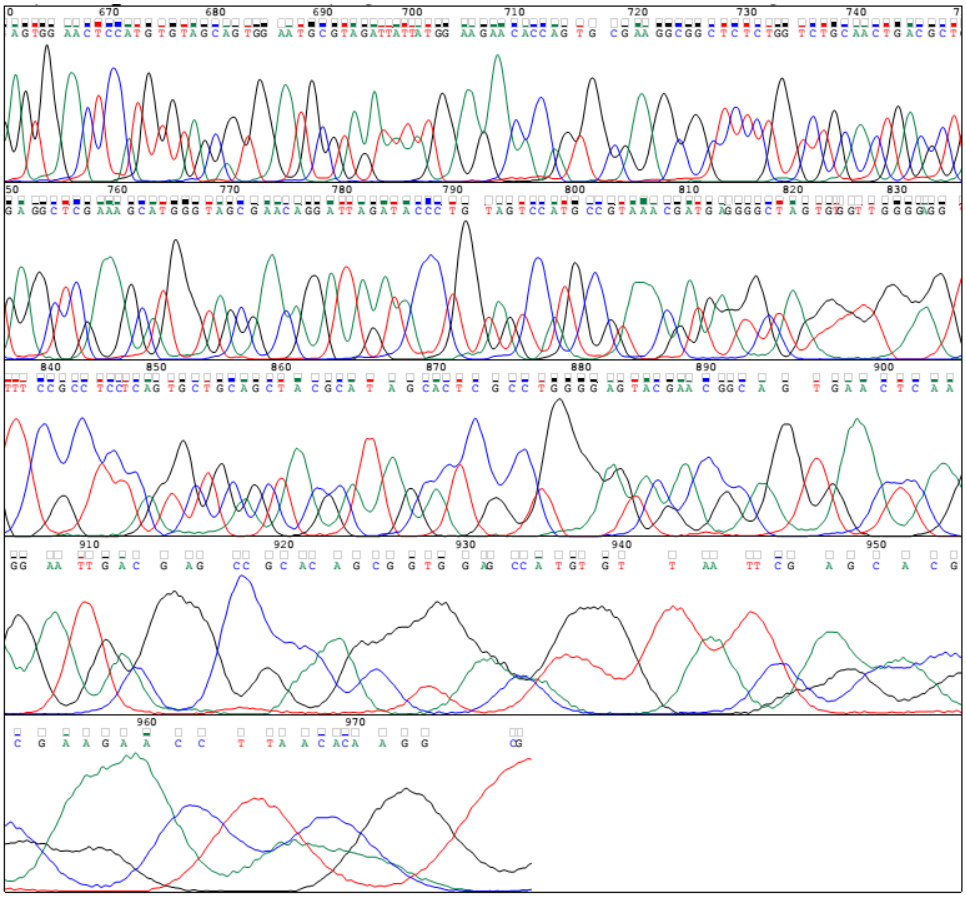
EK B: Laktik asit bakterilerinin antibiyotik hassiyetleri

EK C: *L. gasseri* MA suşlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri

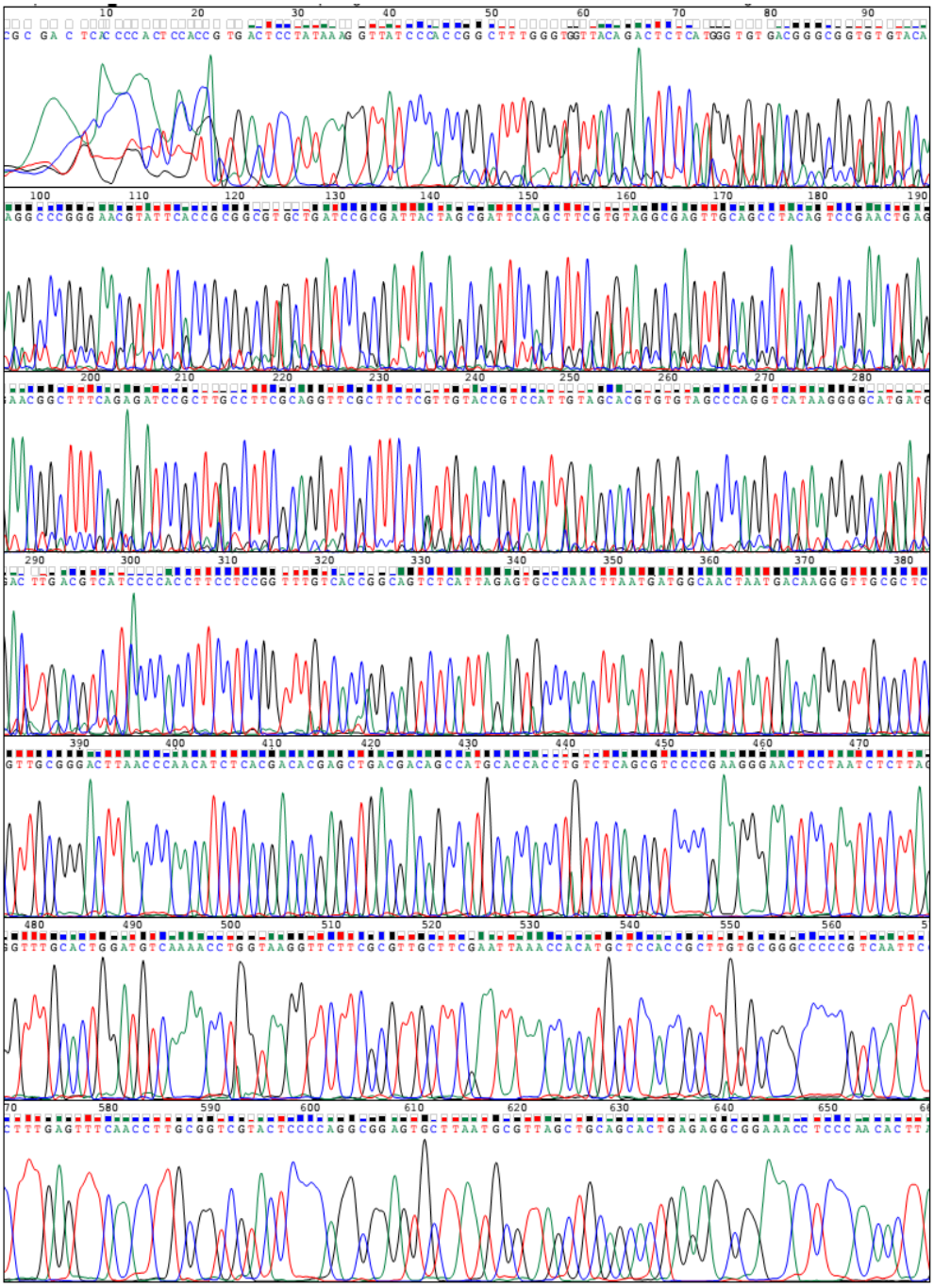
EK.A MA suşlarının PCR ile moleküler olarak identifikasyonu



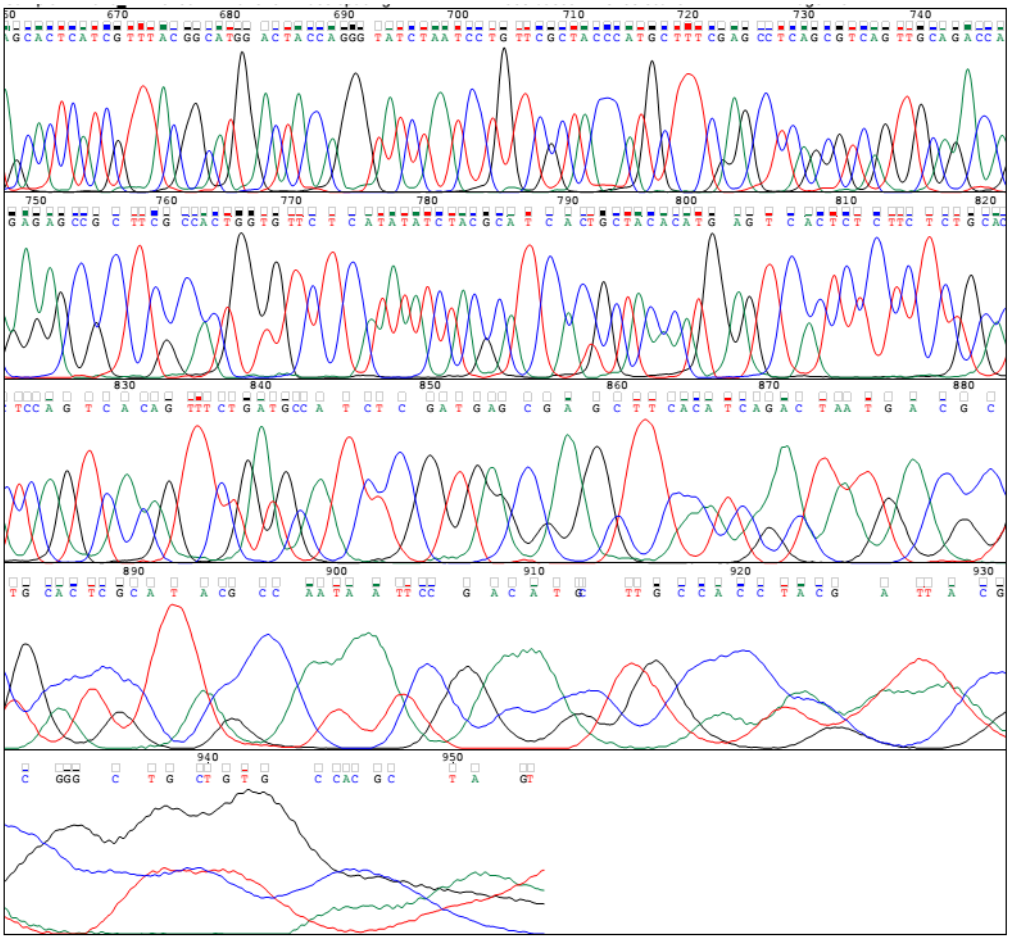
Şekil A.1: MA-1 suşunun PCR ile elde edilen (16 S RNA forward transkripsiyon) sekans dizileri.



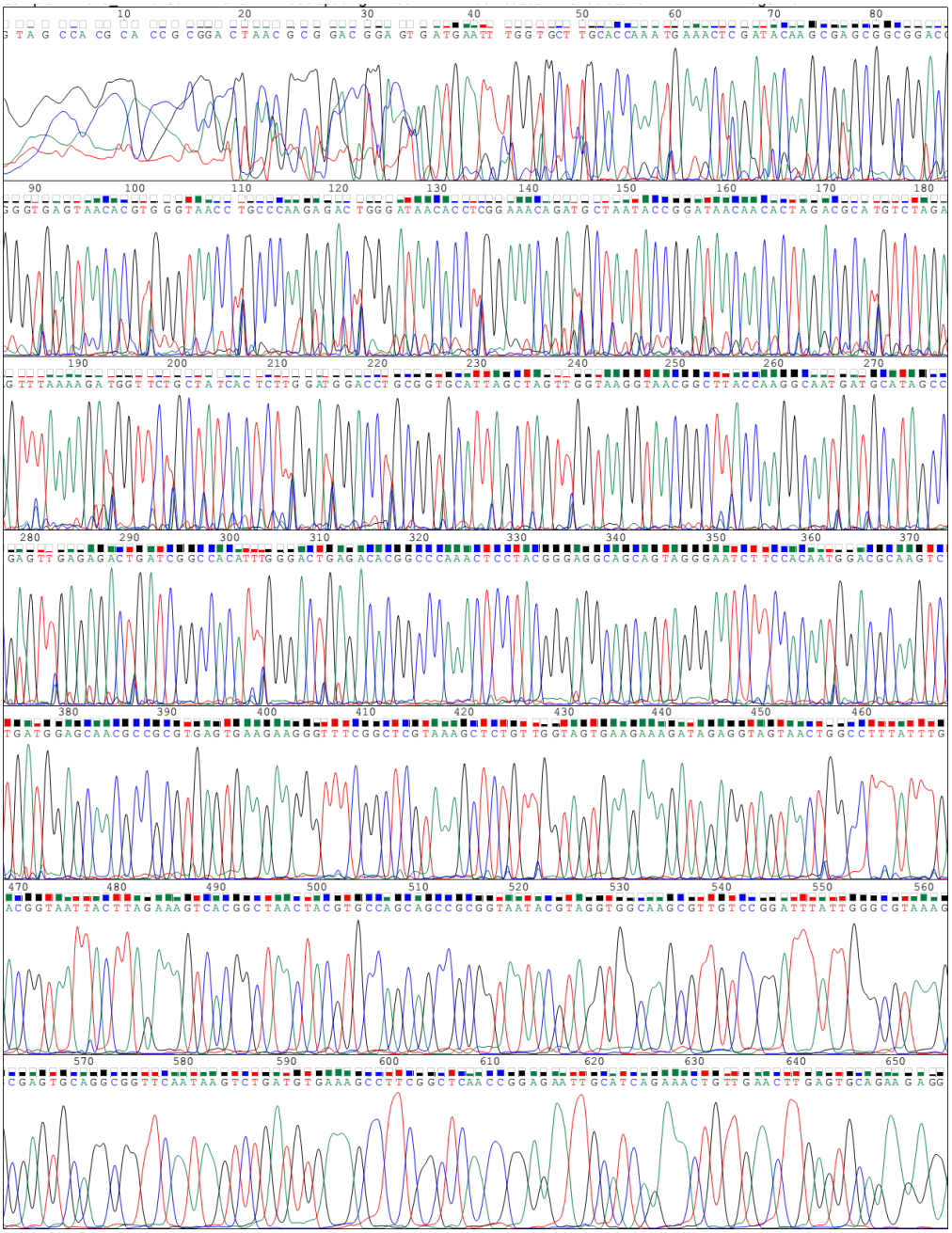
Şekil A.1 (devam) : MA-1 suşunun PCR ile elde edilen (16 S RNA forward transkripsiyon) sekans dizileri.



Şekil A.2: MA-1 suşunun PCR ile elde edilen (16 S RNA reverse transkripsiyon) sekans dizileri.



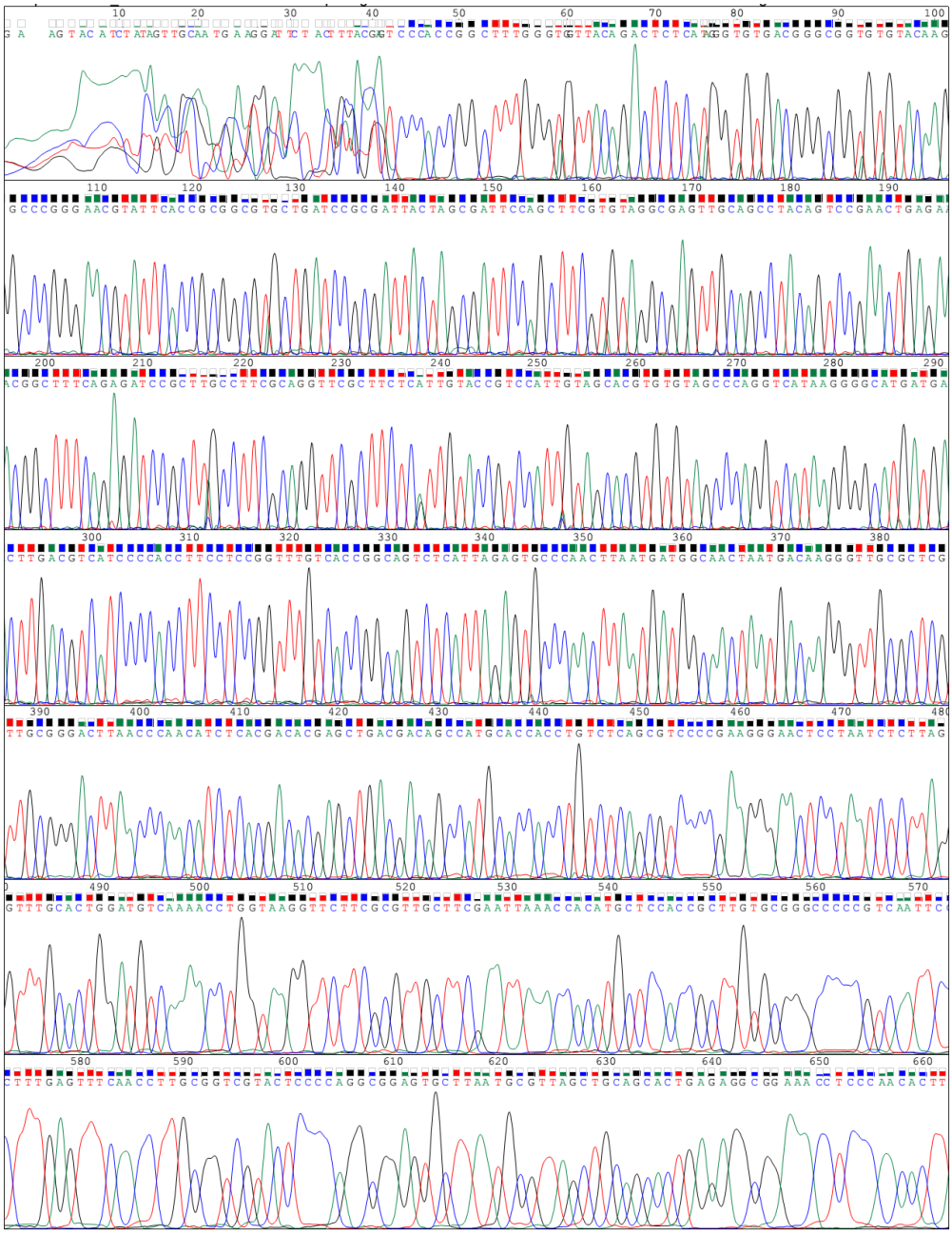
Şekil A.2 (devam) : MA-1 suşunun PCR ile elde edilen (16 S RNA reverse transkripsiyon) sekans dizileri.



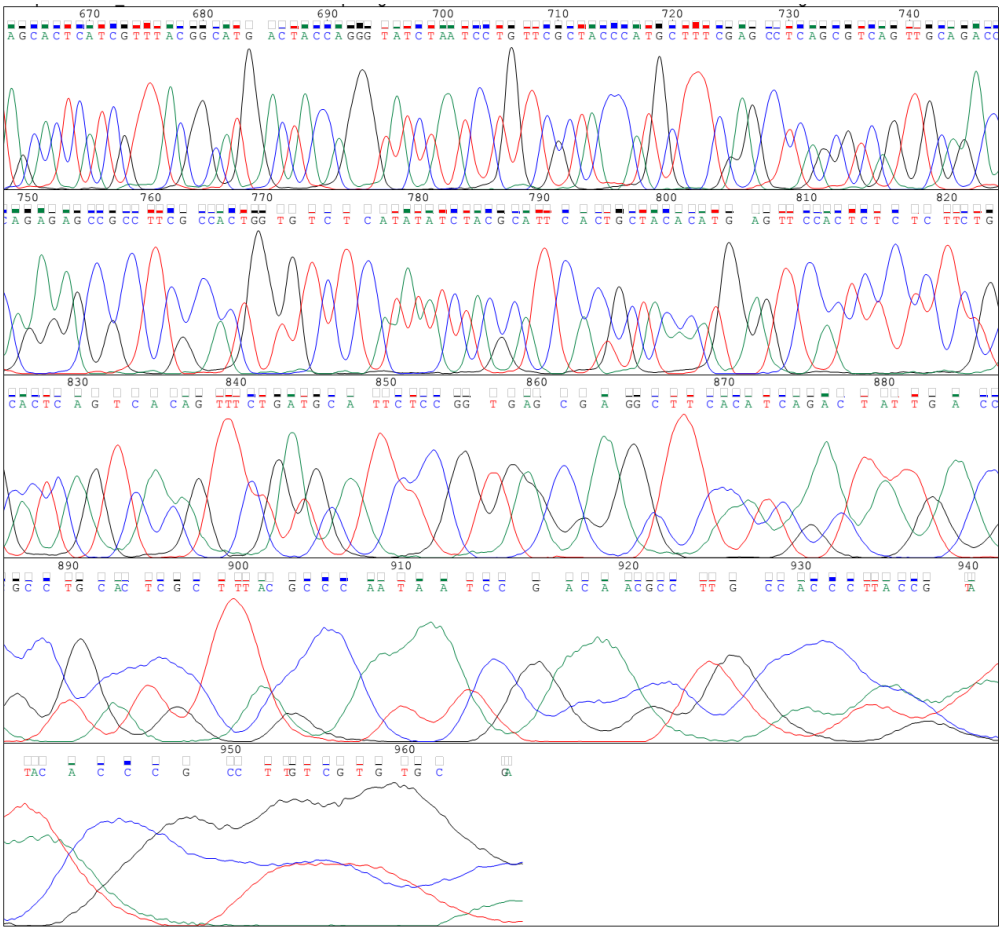
Şekil A.3: MA-2 suşunun PCR ile elde edilen (16 S RNA forward transkripsiyon) sekans dizileri.



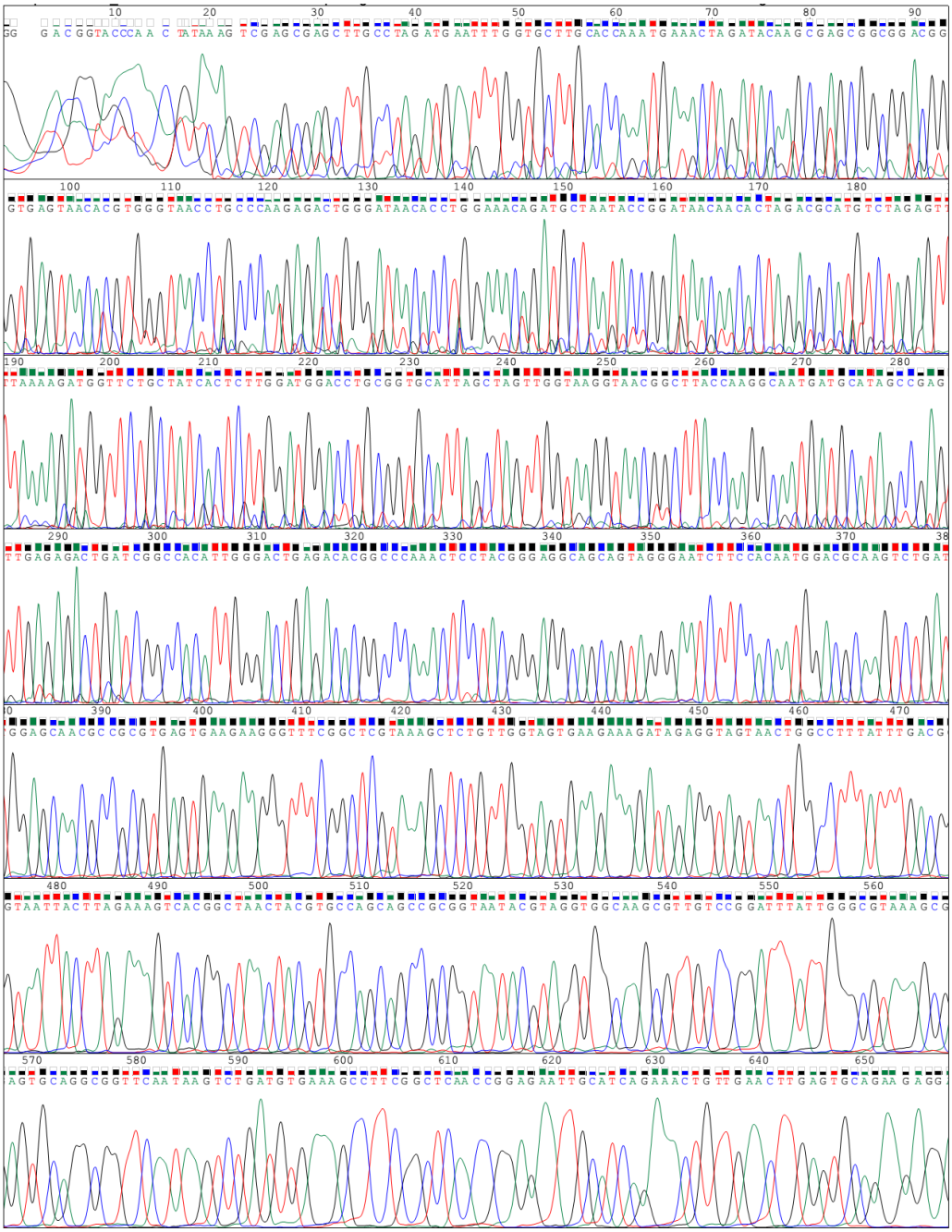
Şekil A.3 (devam): MA-2 suşunun PCR ile elde edilen (16 S RNA forward transkripsiyon) sekans dizileri.



Şekil A.4: MA-2 suşunun PCR ile elde edilen (16 S RNA reverse transkripsiyon) sekans dizileri.



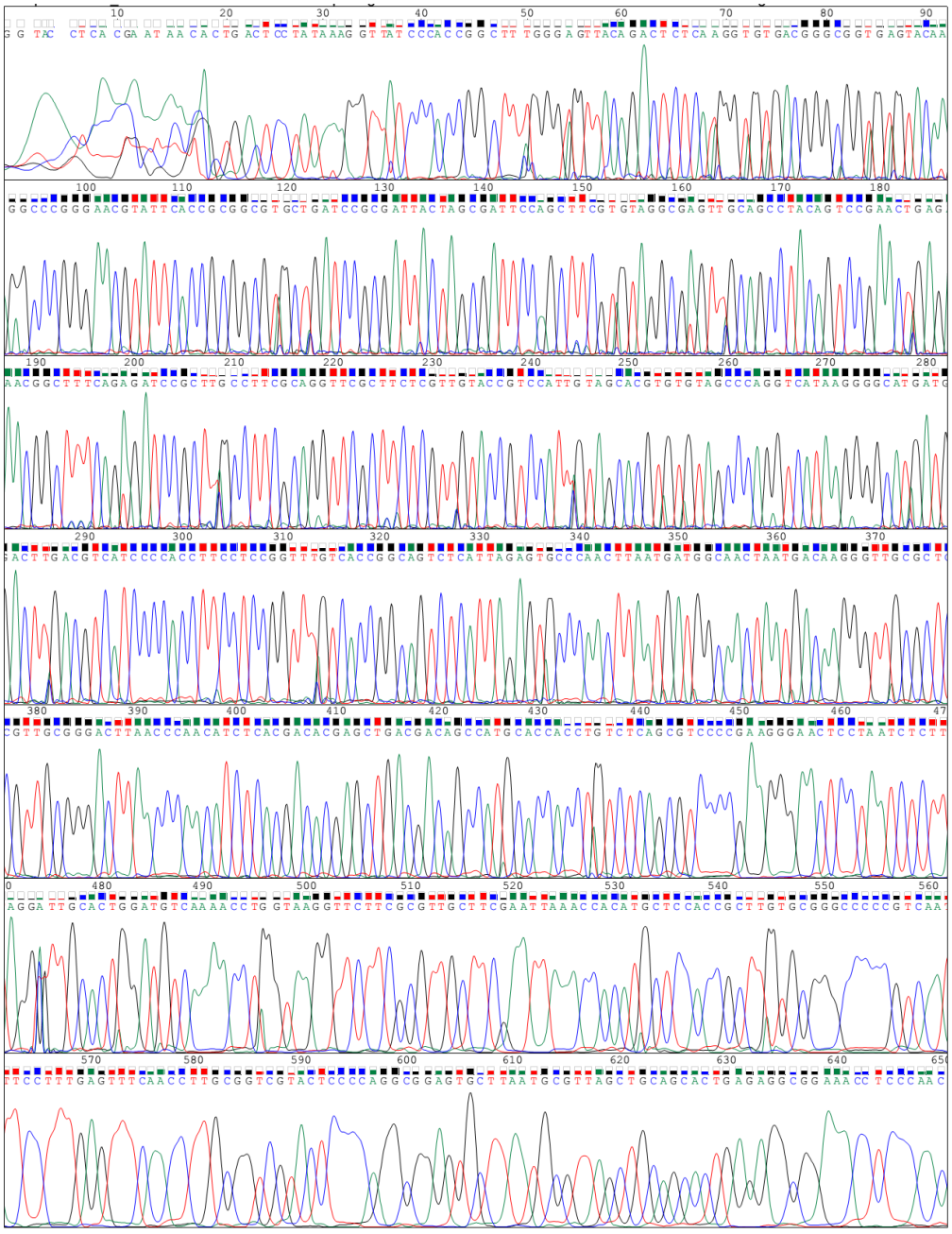
Şekil A.4 (devam): MA-2 suşunun PCR ile elde edilen (16 S RNA reverse transkripsiyon) sekans dizileri.



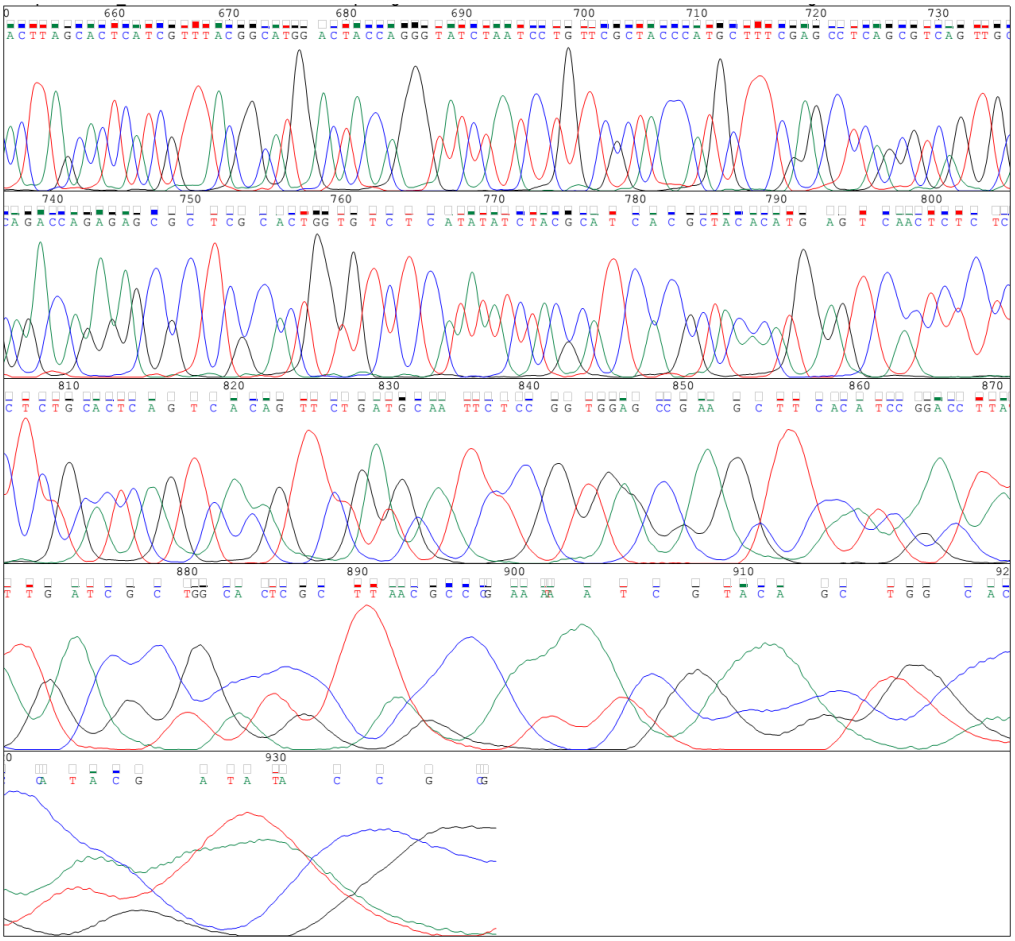
Şekil A.5: MA-3 suşunun PCR ile elde edilen (16 S RNA forward transkripsiyon) sekans dizileri.



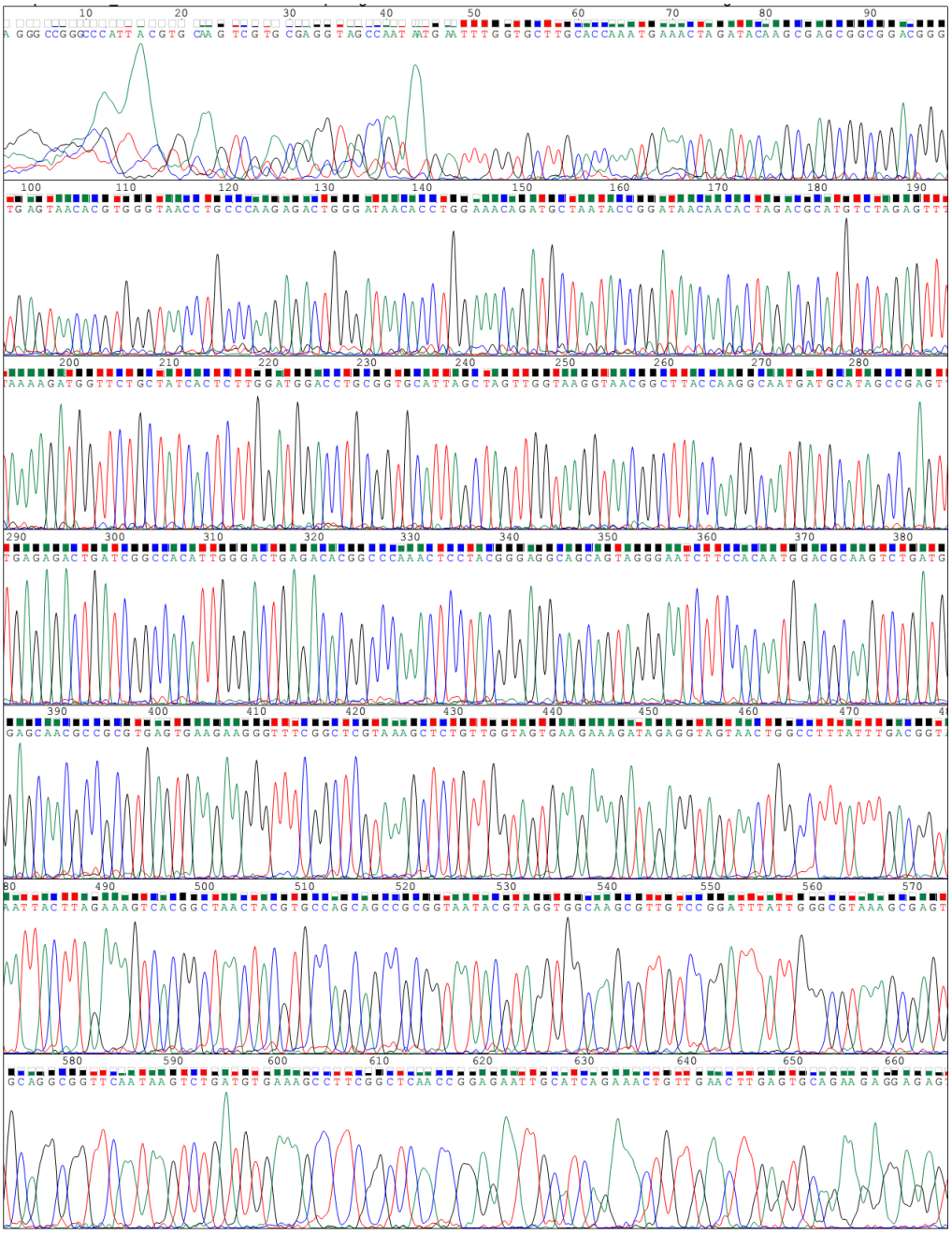
Şekil A.5 (devam): MA-3 suşunun PCR ile elde edilen (16 S RNA forward transkripsiyon) sekans dizileri.



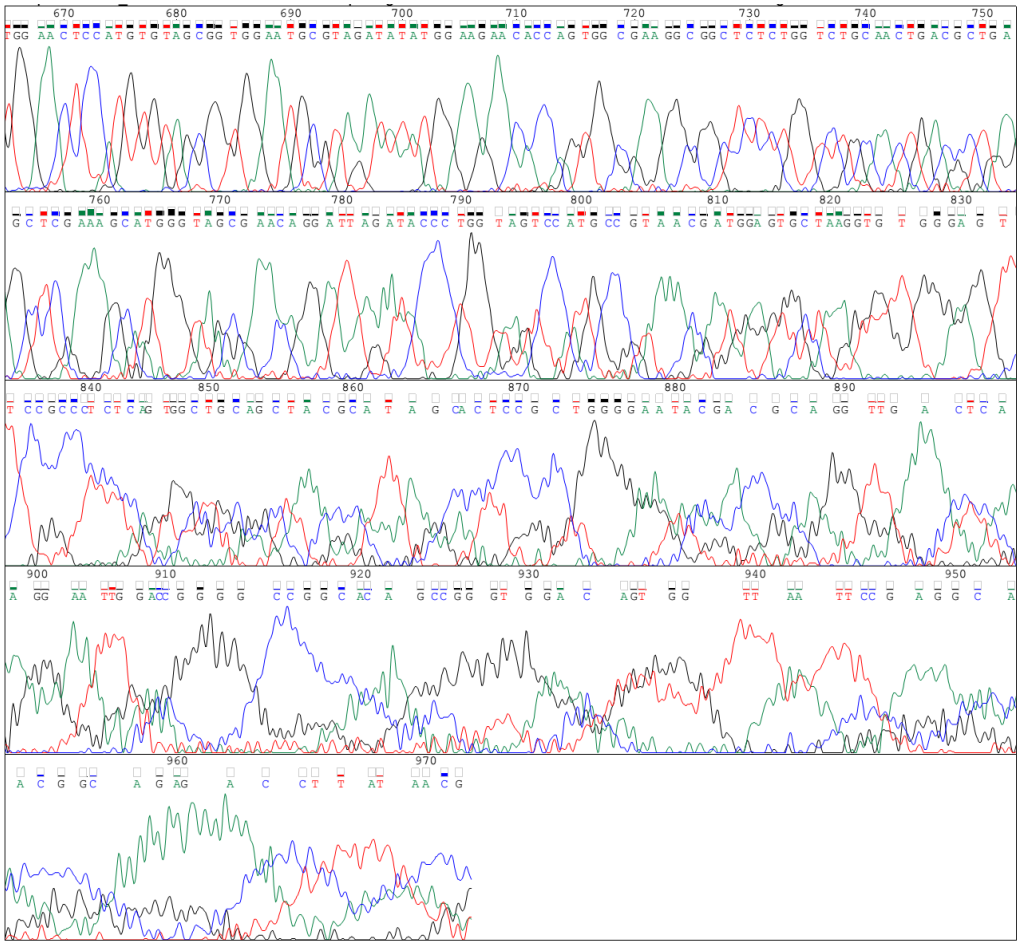
Şekil A.6: MA-3 suşunun PCR ile elde edilen (16 S RNA reverse transkripsiyon) sekans dizileri.



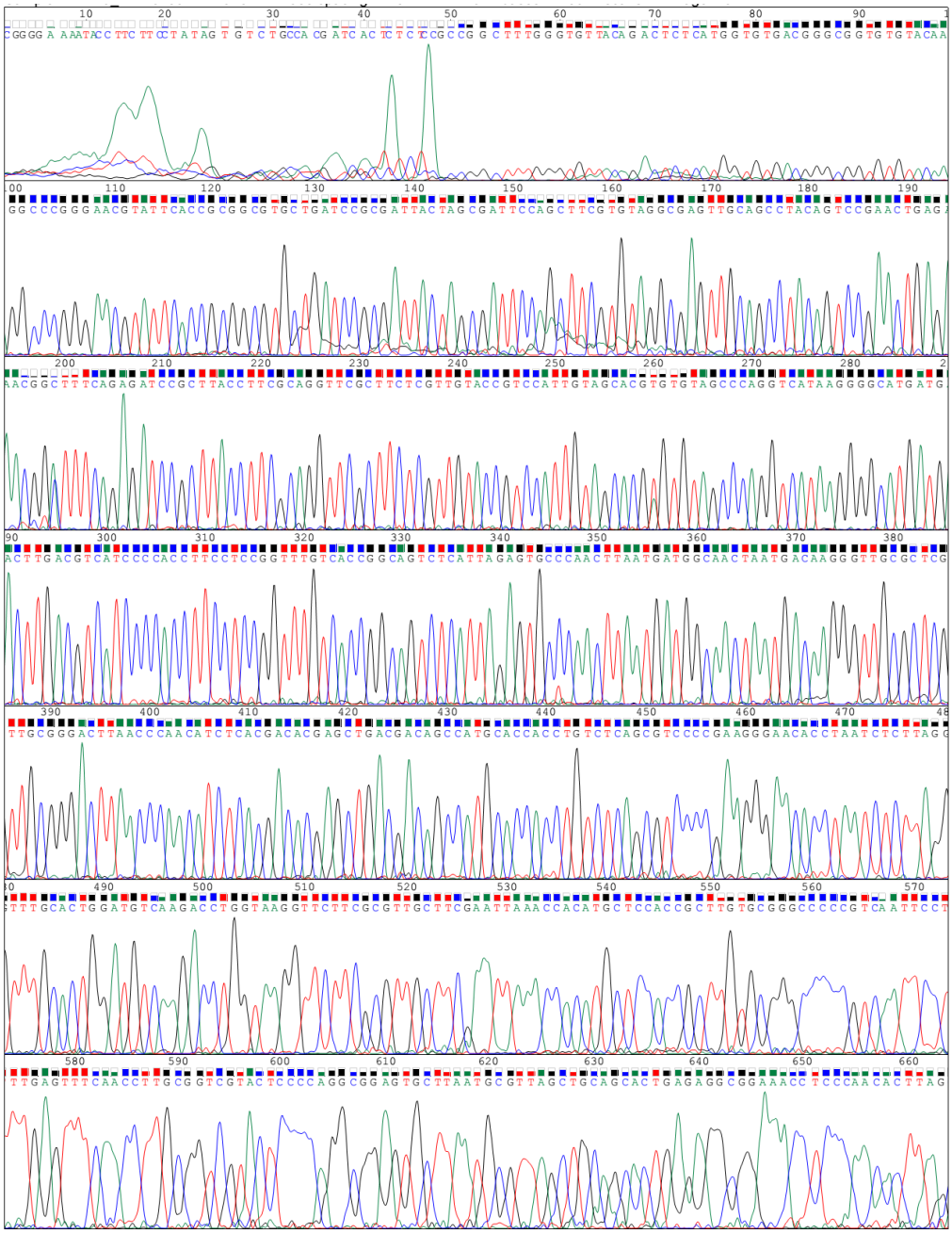
Şekil A.6 (devam): MA-3 suşunun PCR ile elde edilen (16 S RNA reverse transkripsiyon) sekans dizileri.



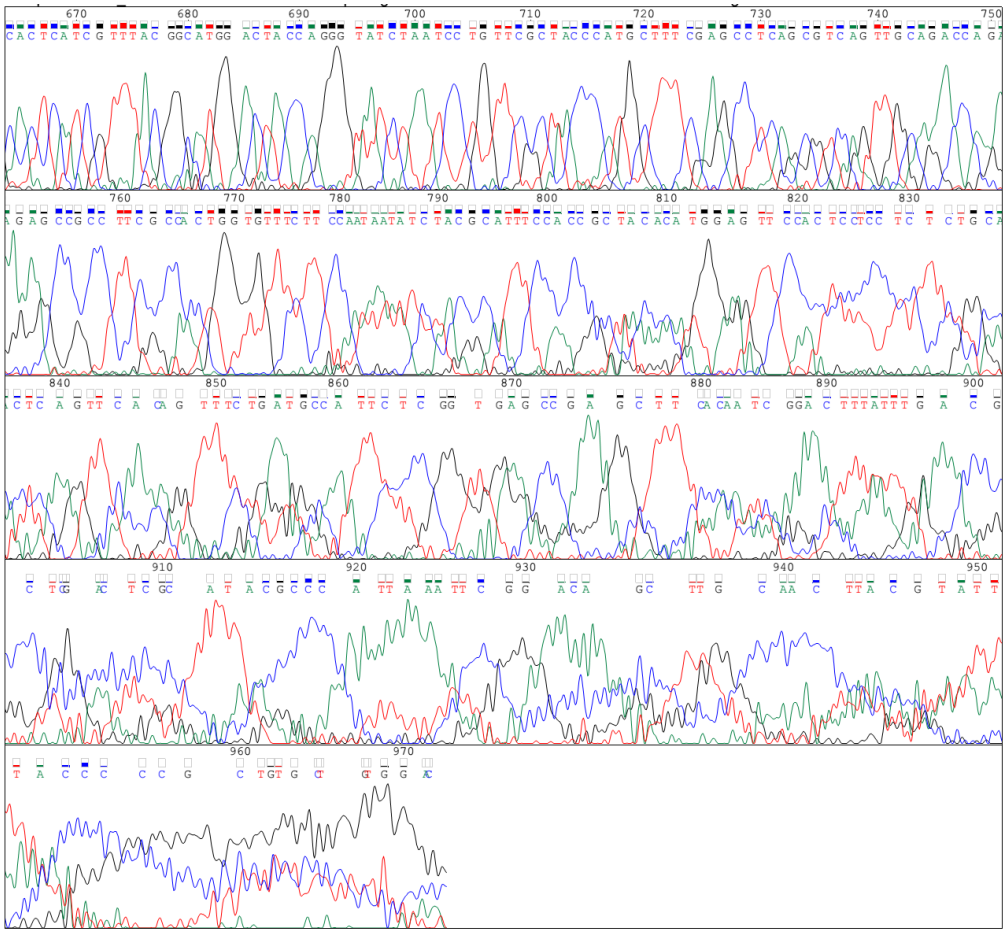
Şekil A.7: MA-4 suşunun PCR ile elde edilen (16 S RNA forward transkripsiyon) sekans dizileri.



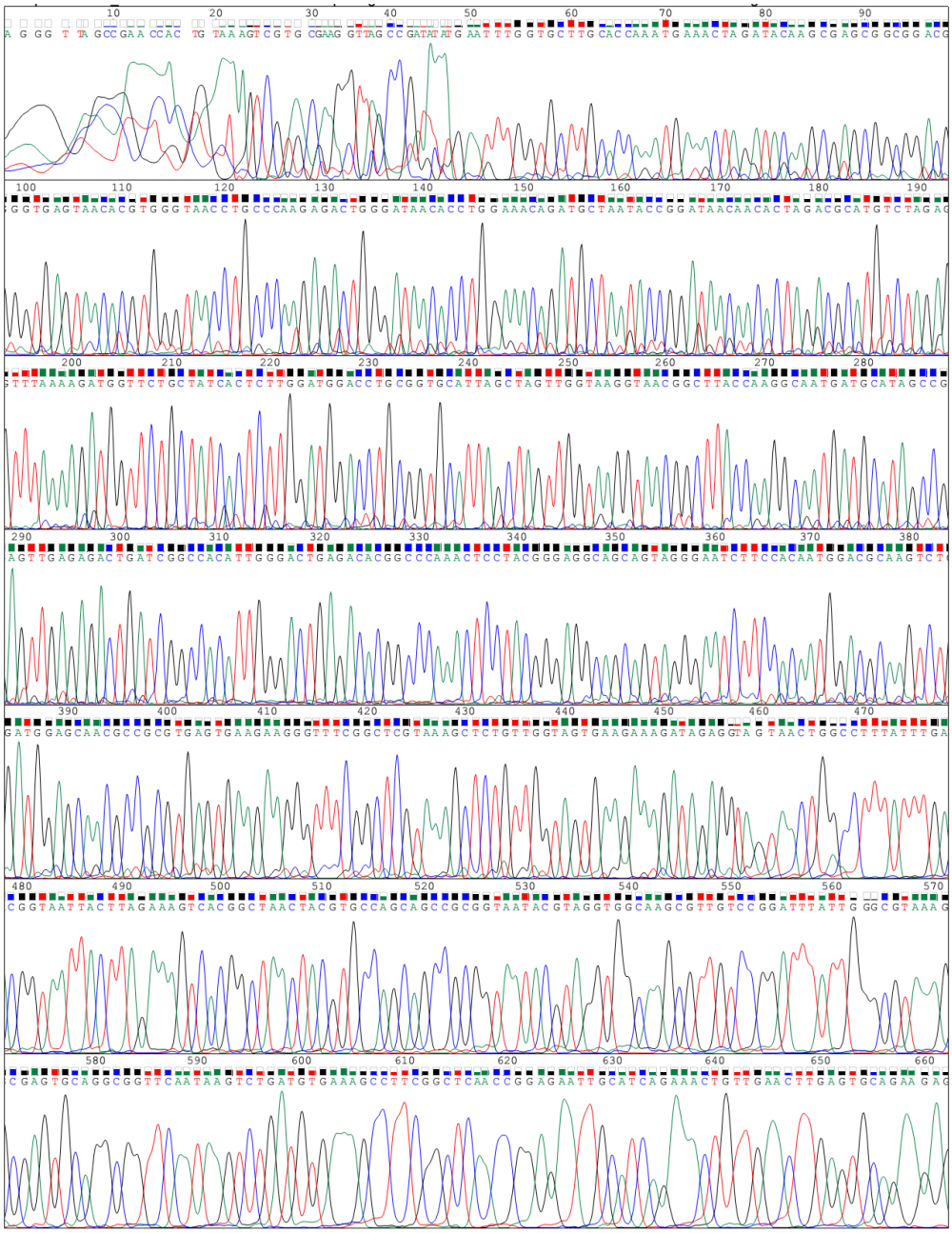
Şekil A.7 (devam): MA-4 suşunun PCR ile elde edilen (16 S RNA forward transkripsiyon) sekans dizileri.



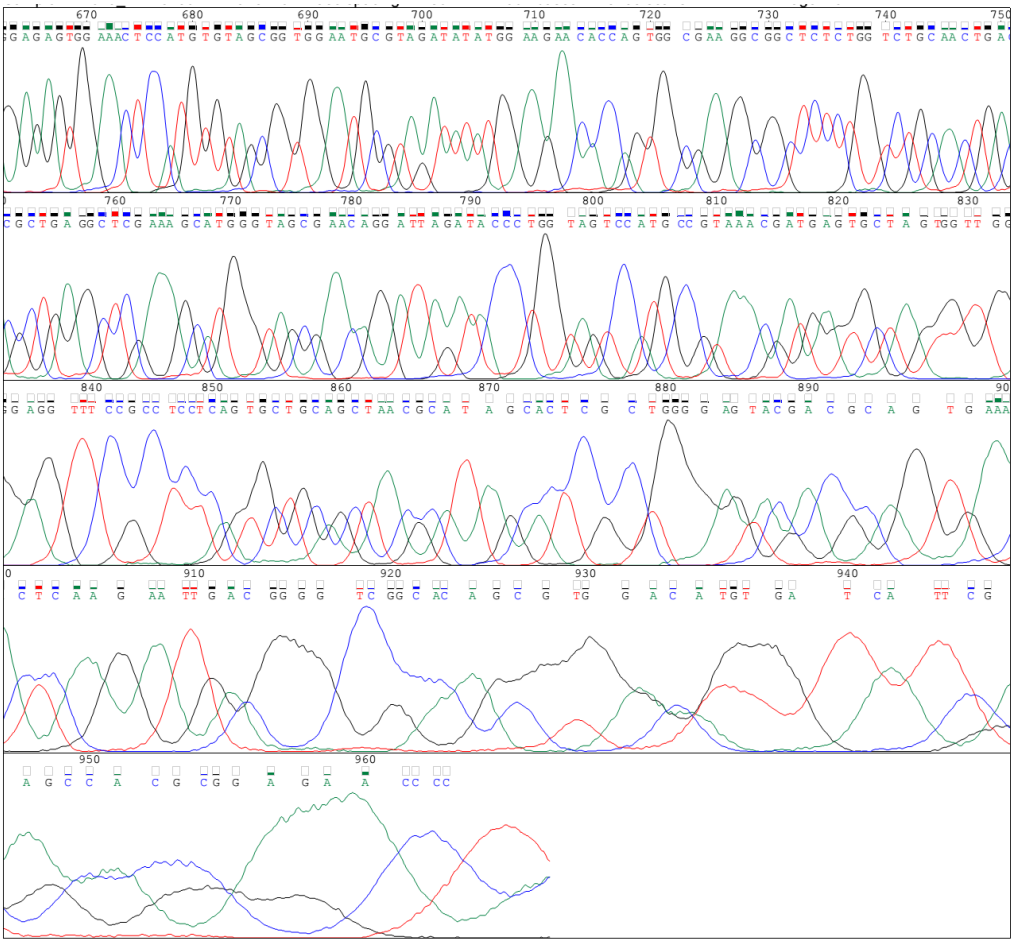
Şekil A.8: MA-4 suşunun PCR ile elde edilen (16 S RNA reverse transkripsiyon) sekans dizileri.



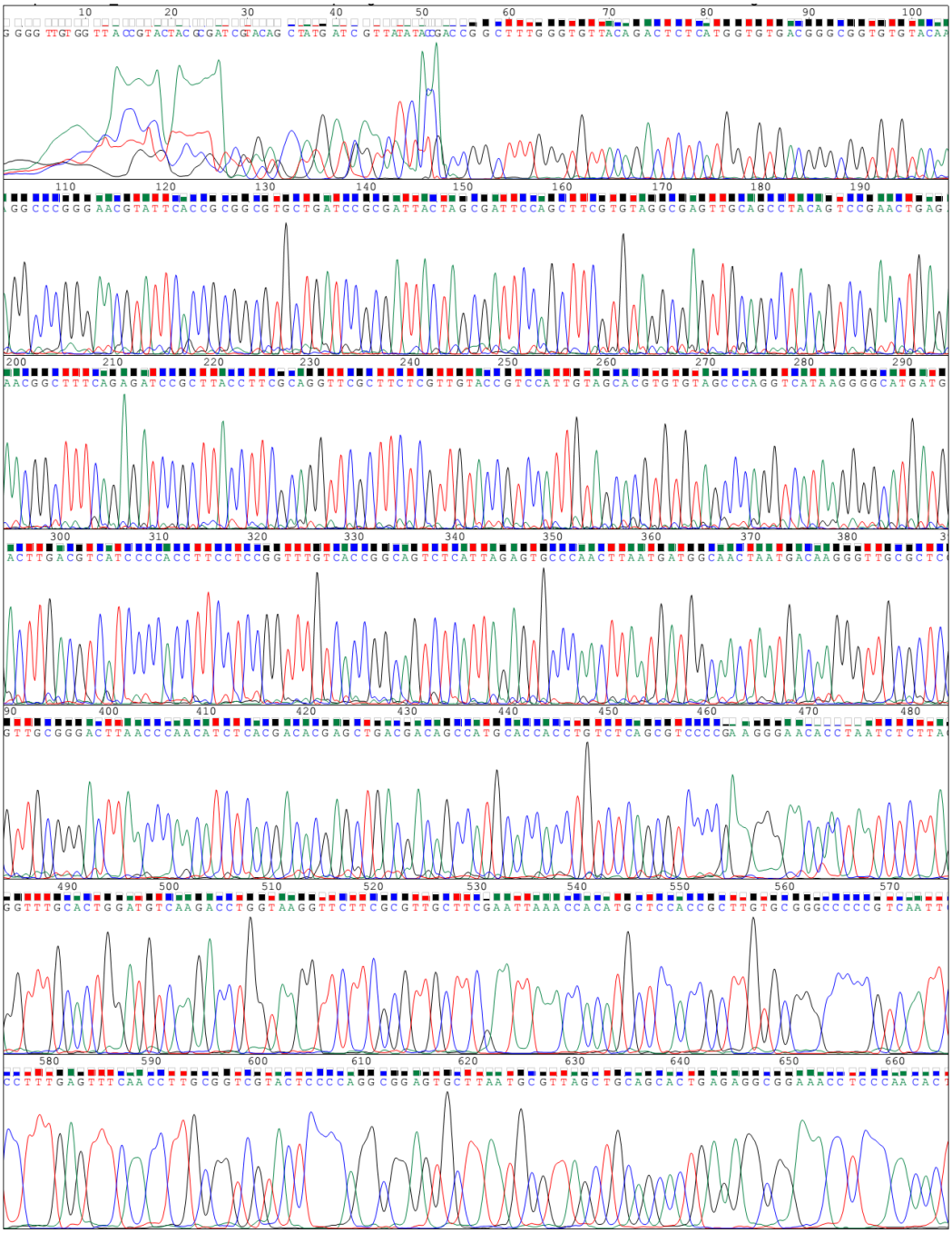
Şekil A.8 (devam): MA-4 suşunun PCR ile elde edilen (16 S RNA reverse transkripsiyon) sekans dizileri.



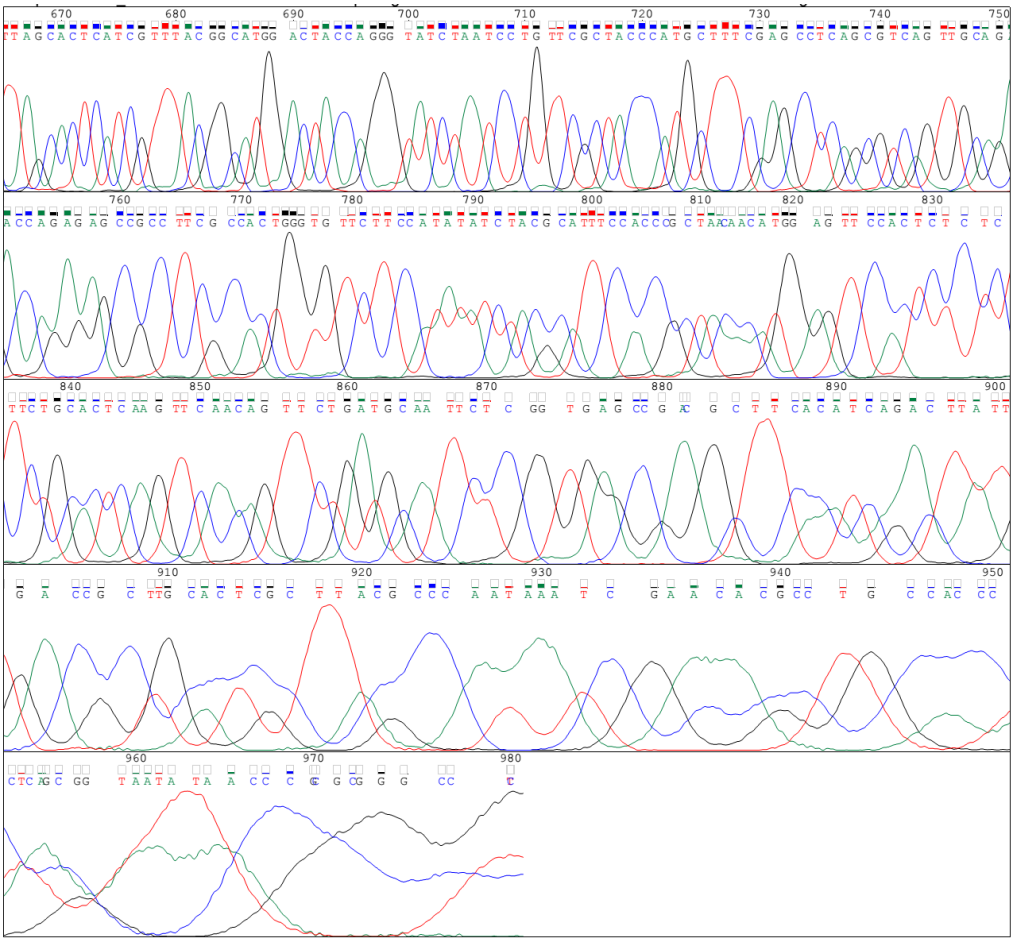
Şekil A.9: MA-5 suşunun PCR ile elde edilen (16 S RNA forward transkripsiyon) sekans dizileri.



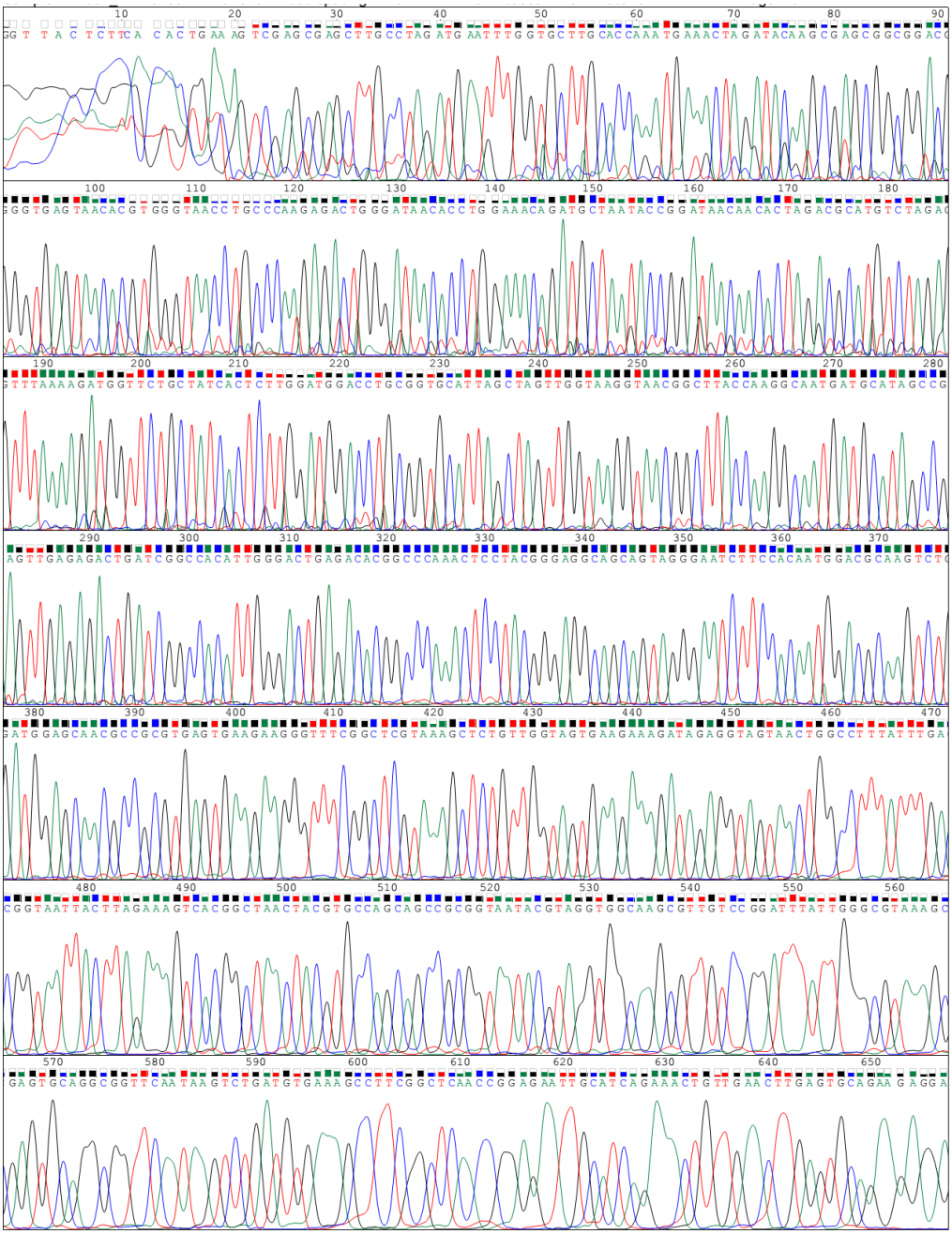
Şekil A.9 (devam): MA-5 suşunun PCR ile elde edilen (16 S RNA forward transkripsiyon) sekans dizileri.



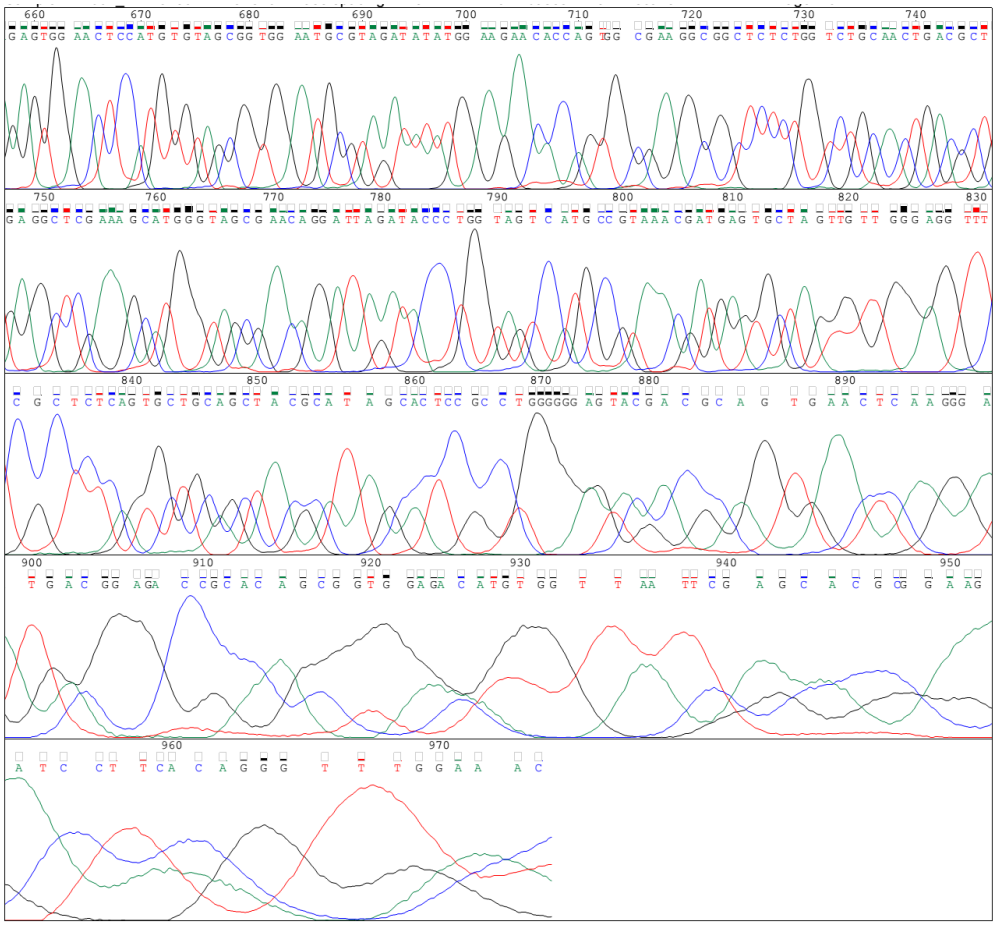
Şekil A.10: MA-5 suşunun PCR ile elde edilen (16 S RNA reverse transkripsiyon) sekans dizileri.



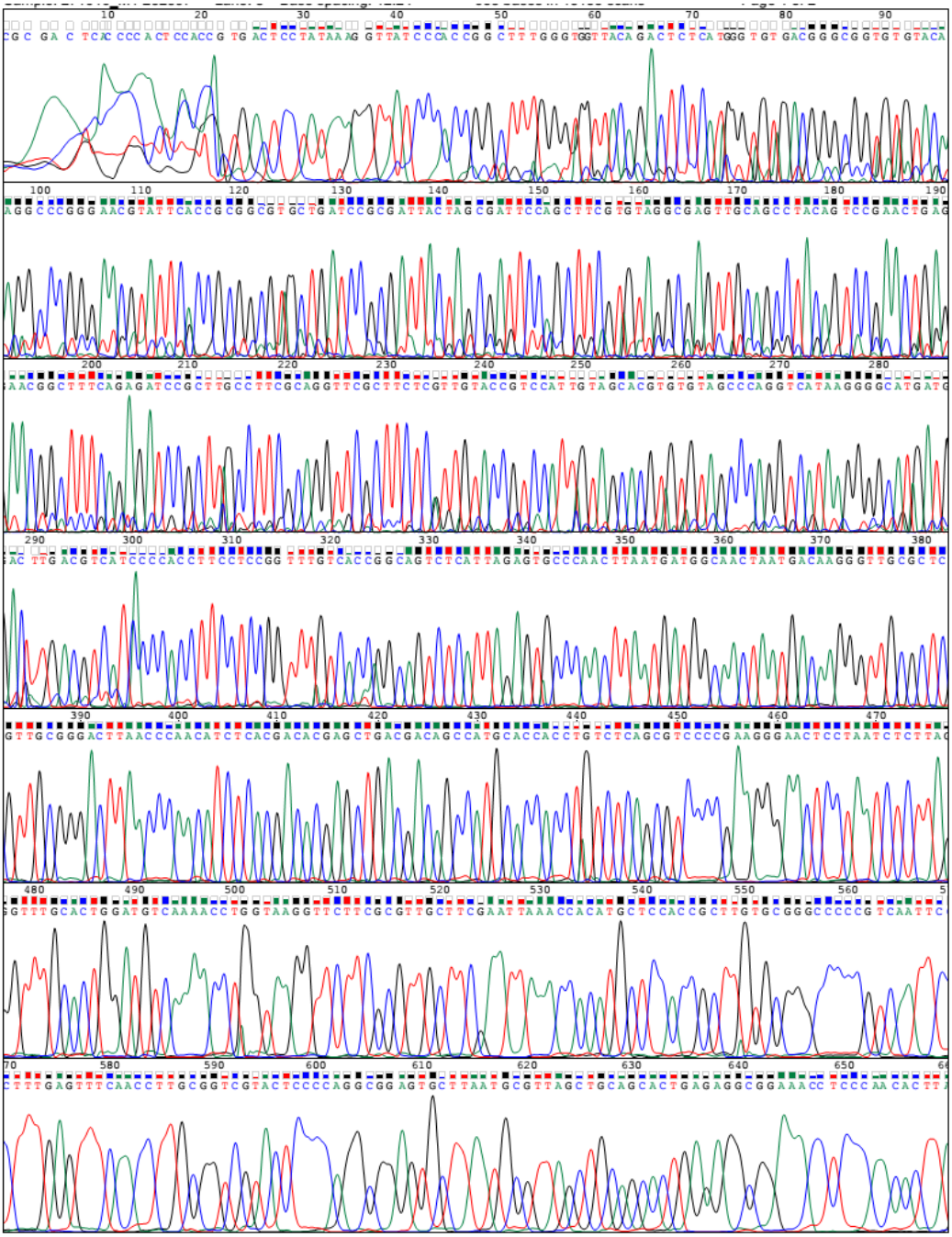
Şekil A.10 (devam): MA-5 suşunun PCR ile elde edilen (16 S RNA reverse transkripsiyon) sekans dizileri.



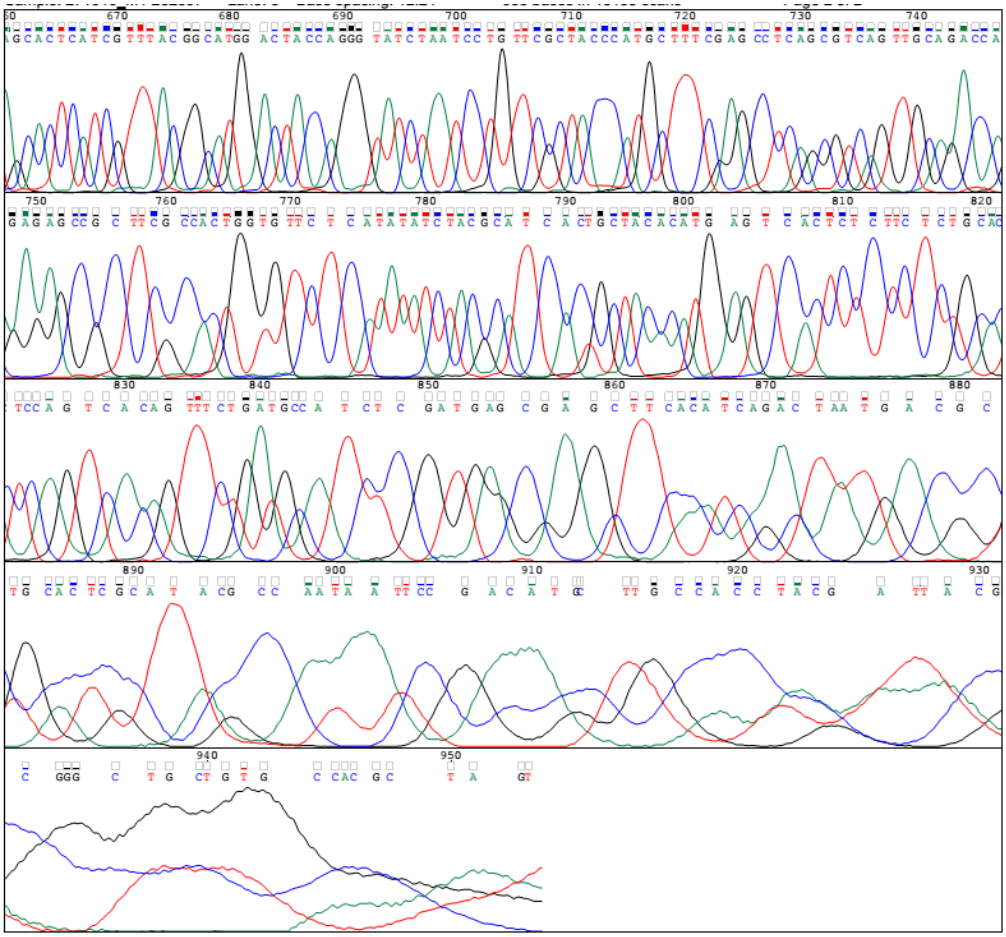
Şekil A.11: MA-6suşunun PCR ile elde edilen (16 S RNA forward transkripsiyon) sekans dizileri.



Şekil A.11(devam): MA-6suşunun PCR ile elde edilen (16 S RNA forward transkripsiyon) sekans dizileri.



Şekil A.12: MA-6 suşunun PCR ile elde edilen (16 S RNA reverse transkripsiyon) sekans dizileri



Şekil A.12 (devam): MA-6 suşunun PCR ile elde edilen (16 S RNA reverse transkripsiyon) sekans dizileri

EK. B: Laktik asit bakterilerinin antibiyotik hassiyetleri.

LAB	AK	AMC	AM	C	OB	E	CN	K	NA	OFX	P
MA-1	-	26.07 ±1.69	23.18 ±2.61	20.72 ±0.91	23.78 ±0.85	24.63 ±2.24	6.27 ±0.19	-	-	-	31.69 ±2.41
MA-2	-	27.35 ±2.70	24.31 ±0.63	24.37 ±1.01	23.68 ±2.40	26.50 ±4.35	7.52 ±0.0	-	-	-	33.19 ±1.26
MA-3	-	29.65 ±1.61	28.72 ±0.63	23.22 ±0.90	24.40 ±0.40	30.60 ±0.56	-	-	-	-	32.86 ±1.45
MA-4	-	29.10 ±0.80	21.98 ±0.88	24.24 ±1.25	20.12 ±0.45	28.25 ±1.51	6.49 ±0.22	-	-	-	25.53 ±1.99
MA-5	-	23.70 ±1.48	21.28 ±0.03	18.67 ±2.25	23.76 ±0.67	25.44 ±2.88	8.30 ±0.85	-	-	-	29.61 ±2.60
MA-6	-	25.14 ±0.97	23.47 ±2.46	24.50 ±0.30	24.29 ±0.91	29.56 ±0.90	-	-	-	-	33.88 ±0.44

* AK (10 µg): amikasin, AMC (30 µg): amoksisilin, AM (10 µg): ampisilin, C (10 µg): kloramfenikol, OB (5 µg): kloksasilin, E (15 µg): eritromisin, CN (10 µg): gentamisin, K (30 µg): kanamisin, NA (5 µg): nalidiksik asit, OFX (5 µg): Ofloksasin, P (10 µg): penisilin.

EK. C: *L. gasseri* MA suşlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri.

Test Mikroorganizmaları	MA-1	MA-2	MA-3	MA-4	MA-5	MA-6
E.coli ATCC 11229	2.55±0.69	-	-	4.32±0.73	3.23±0.58	-
E. coli O157:H7	3.56±0.40	-	3.15±0.40	3.91±0.85	3.39±0.16	-
B. megaterium (Pasteur Ens.5117)	4.34±0.20	-	-	3.32±0.76	4.75±1.10	-
S. enteritidis RSKK 171	2.85±0.81	5.01±0.01	4.47±0.98	3.00±0.85	4.61±0.80	-
B. cereus RSKK 863	3.11±0.60	-	3.15±0.43	3.35±0.21	3.33±0.45	-
B. subtilis RSKK 244	6.11±0.42	-	3.83±0.50	4.96±0.77	5.46±0.29	-

EK. C (devam): *L. gasseri* MA suşlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri.

E. coli ATCC 35218	-	-	-	3.52±0.38	3.04±0.02	-
M. luteus NRRL B_ 4375	-	2.91±0.41	-	-	-	3.81±0.61
S. enteritidis ATCC 13076	2.90±0.62	3.22±0.82	3.43±0.41	-	5.65±0.35	-
S. sonnei MU:57	-	3.87±0.16	-	-	-	-
S. aureus ATCC 25923	3.64±0.49	-	4.35±0.04	9.04±1.05	8.20±0.93	-
Y. enterocolitica ATCC 11175	4.06±0.16	3.11±0.35	5.08±1.53	3.35±0.36	4.74±0.58	-
E. faecalis ATCC 29212	2.99±1.14	2.54±0.29	-	3.19±0.58	1.87±0.29	-
L. monocytogenes ATCC 7644	14.19±1.41	10.82±0.97	7.95±0.45	7.51±0.98	6.52±0.99	6.55±0.60
S. epidermidis ATCC 11228	11.03±1.01	14.29±0.47	11.91±0.27	12.79±0.32	8.64±0.40	12.55±0.46
V. alginolyticus	5.91±0.99	4.99±0.31	5.51±0.43	4.34±0.24	4.55±0.58	7.03±0.42
V. anguillarum M1	4.18±0.00	3.51±0.25	3.07±0.20	4.07±0.08	2.67±0.49	3.05±0.22
V. anguillarum A4	3.02±0.47	3.37±0.73	2.39±0.42	4.77±0.23	3.15±0.27	1.66±0.21
A. hydrophila ATCC 19570	5.47±0.50	11.22±1.11	10.31±1.46	8.24±0.70	7.32±0.93	6.29±0.77
L. garvieae	5.18±0.47	3.50±0.28	4.63±0.03	3.61±0.34	3.42±0.44	3.97±0.22
Y. ruckeri	-	4.48±0.82	3.92±0.09	3.53±0.32	4.14±0.20	4.90±0.43
S. agalactiae	4.27±0.83	4.73±0.51	3.99±0.59	4.01±0.54	6.93±0.72	5.31±0.38

EK. C (devam): *L. gasseri* MA suşlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri.

Candida albicans ATCC 10231	3.25±1.01	4.80±0.42	3.63±0.75	3.22±0.07	3.42±0.69	3.25±0.44
Candida glabrata RSKK 04019	4.06±0.08	-	-	2.78±0.1	3.28±0.54	-

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Ayşe Günyaktı

Doğum Tarihi ve Yeri : 25.01.1991- Altındağ/Ankara

E-posta adresi : gunyaktiayse@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Lisans : Aksaray Üniversitesi
Biyoloji Bölümü 2009-2013 (onur)

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi
Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Bölümü
2014-2017

Bilimsel Etkinlikler

1) Meltem Aşan Özüsağlam, Zübeyde Balık, **Ayşe Günyaktı**, Ayşe Yavuz, 2014. *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Kladot ve Meyve Ekstrelerinin Balık Patojenlerine Karşı Yem Katkısı Olarak Kullanım Potansiyelinin Araştırılması. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir Osmangazi Üniveristesi. (Poster Sunumu).

2) Meltem Aşan Özüsağlam, **Ayşe Günyaktı**, 2015. *Fortunella margarita* ve *Citrus myrtifolia* Bitkilerinin Meyve ve Yaprak Ekstrelerinin Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi, 18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi,18-19 Aralık 2015, Konya, s144 (Poster Sunumu).

3) Meltem Asan Ozusaglam, **Ayse Gunyakti**, 2016. The Inhibitory Activity of Pummelo (*Citrus maxima*) Different Extracts on *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. International Conference on Natural Science and Engineering (ICNASE'16) March 19-20, Kilis, s.61 (Sözlü sunum).

4) **Ayse Gunyakti,** Meltem Asan Ozusaglam, 2016. Determination of Antimicrobial and Antioxidant Activity of *Lactobacillus gasseri* Derived from Human Breast Milk. 2nd International Congress on the World of Technology and Advanced Materials (WITAM 2016) 28 September-02 October, Kirşehir/Turkey, OP129 (sözlü sunum).

5) Meltem Asan Ozusaglam**, Ayse Gunyakti**, Cagatay Yetım, Seda Gevrek, Muhammed Nebı Tomruk, Bahar Mergen, 2016. Investigation of Antimicrobial Activity of *Persea americana* Fruit Extracts and Their Potential Use as Alternative to

Sodium Benzoate as Food Preservative against Fish Pathogens. 2nd International Congress on the World of Technology and Advanced Materials (WITAM 2016) 28 September-02 October, Kirsehir/Turkey, PP151 (Poster Sunumu).

Projeler

1) *Gryllotalpa gryllotalpa'*dan Elde Edilmiş Kitosanın Antimikrobial ve Antioksidan Aktivitelerinin Araştırılması (ASÜ BAP 2015-051) **Yardımcı Araştırmacı**.

2) İnsan Kaynaklı Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması ve Probiyotik Olarak Kullanılma Potansiyellerinin Belirlenmesi (ASÜ BAP 2017-68001) **Yardımcı Araştırmacı**.

Yayınlar

1) **Ayse Gunyakti**, MeltemAsan-Ozusaglam, Muhammad Mujtaba, Assessment of Biological and Antioxidant Capacities of *Myrtus communis* L. Leaf and Fruit Extracts from Mediterranean Region of Turkey, J Microbiol Biotech Res, 2017, 7 (1): 26-32, DOI: 10.24896/ jmbr.2017.