

Gluten Degrede Eden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Seda Hacıođlu

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Aralık 2020

Isolation and Characterization of Gluten Degrading Lactic Acid Bacteria

Seda Hacıođlu

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

December 2020

Gluten Degrede Eden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Seda Hacıođlu

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Yönetmeliđi Uyarınca

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalında

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Buket Kunduhođlu

“Bu tez BAPK tarafından 2020-3114 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.”

Aralık 2020

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Doç. Dr. Buket Kunduhođlu danışmanlığında hazırlamış olduğum “Gluten Degrede Eden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Karakterizasyonu” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 26/11/2020

Seda Hacıođlu

İmza

ÖZET

Çölyak hastalığı (ÇH), genetik olarak yatkın kişilerde ortaya çıkan kronik bir otoimmün hastalıktır. Gluteni antijenik olmayan peptidlere parçalayan probiyotikler, ÇH'li bireylerde semptomları hafifletmek ve bağırsaklarındaki yararlı mikrobiyotayı geliştirme konusunda umut vericidir. Bu nedenle bu çalışmada farklı un, ekşi maya, hamur ve peynir örneklerinden izole edilmiş laktik asit bakterisi (LAB) suşlarının gluten hidroliz yetenekleri ve probiyotik özellikleri belirlenmiştir. Bu suşlar içinde buğday gluteni bulunan iki farklı Gluten Agara (GA-1 ve GA-2) ekilmiş ve inkübasyonun ardından plaklar Coomassie Blue Brilliant R-250 protein boyası ile boyanmıştır. GA-1 ve GA-2 plaklarında gelişen kolonilerin çevrelerindeki renksiz zonlar gluten hidrolizini işaret etmiştir. İzolatlardan (119 adet) 43'ünün, hem aerobik hem de anaerobik koşullarda gluteni hidrolize edebilen LAB suşları olduğu belirlenmiştir. Daha sonra bu suşların bazı temel probiyotik özellikleri araştırılmıştır. Düşük pH'da (pH 1-4), safra tuzlarında (%0,3-0,6) ve yapay mide sıvısında (pH 2 ve 3) canlı kalan suşlar arasından en iyi olanları seçilmiş (11P, 16P, 38P, 104P, 16, 23, 24, 28, 65, 68, 107 ve 108) ve bunlar sonraki çalışmalarda kullanılmıştır. Bu suşlardan otoagregasyon kapasitesi ve hidrofobisitesi en yüksek olanlar, sırasıyla, 108 (%23,9) ve 24 nolu (%99,2) suşlardır. Suşların çoğunluğu aerobik koşulda, anaerobik koşuldakine göre, daha geniş hidroliz zon çapları oluşturmuştur. 23, 24, 68 ve 107 no.lu suşlar pH'ı 3-8 arasında değişen GB-2 besiyerlerine ekilmiş ve tüm pH seviyelerinde gluten hidrolizi meydana geldiği belirlenmiştir. 38P nolu suşun 33-mer peptidlerin miktarını 495,2 mg/dl'den 431,6 mg/dl'ye düşürdüğü görülürken, 107 nolu suş 369,9 mg/dl'ye düşürmüştür. 107 no.lu suşun, konağı enfeksiyondan koruyucu/tedavi edici etkisi (*Escherichia coli*_O157:H7'ye karşı) ve enfektif dozunu belirlemek için *Galleria mellonella* larvaları kullanılmıştır. Sonuç olarak 107 no.lu suşun koruyucu etkisi %91 iken, tedavi edici etki %84 olmuştur.

Çalışmadan elde edilen bulgular, gluteni hidrolize edebilen ve birçok temel probiyotik özelliğe sahip olan suşların, ÇH'li bireyler için probiyotik takviye olarak kullanım potansiyeli olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Laktik asit bakterisi, Probiyotikler, Çölyak, Gluten hidrolizi, Gliadin hidrolizi, *Galleria mellonella*

SUMMARY

Celiac disease (CD) is a chronic autoimmune disease that occurs in genetically susceptible individuals. Probiotics that break down gluten into non-antigenic peptides for susceptible individuals are promising for relieving symptoms in individuals with CD and improving the beneficial microbiota in the host gut. Therefore, gluten hydrolysis capabilities and probiotic properties of LAB strains isolated from different flour, sourdough, dough and cheese samples were determined in this study. These isolates were inoculated into two different Gluten Agar plates (GA-1 and GA-2) containing wheat gluten, after incubation the plates were stained with Coomassie Blue Brilliant R-250 protein dye. Colorless zones around the colonies that developed in GA-1 and GA-2 plates indicated gluten hydrolysis. It was determined that 43 of the 119 isolates were LAB strains that can hydrolyze gluten under both aerobic and anaerobic conditions. Then, some basic probiotic properties of these strains were investigated. Among the strains that survive at low pH (pH1-4), bile salts (0.3-0.6%) and artificial gastric fluid (pH2 and 3), the best ones were selected (11P, 16P, 38P, 104P, 16, 23, 24, 28, 65, 68, 107, and 108), and these were used in subsequent studies. Among these strains, the ones with the highest auto-aggregation capacity and hydrophobicity are 108 (23.9%) and 24 (99.2%) strains, respectively. Compared to anaerobic condition, most of the strains produced larger hydrolysis zone diameters in aerobic condition. Strains 23, 24, 68 and 107 were inoculated into GB-2 broth with pH varying ranged 3-8 and it was determined that gluten hydrolysis occurred at all pH levels. While strain 38P decreased the amount of 33-mer peptides from 495.2 mg/dl to 431.6 mg/dl, strain 107 decreased to 369.9 mg/dl. *Galleria mellonella* larvae were used to determine the preventive / therapeutic effect (against *Escherichia coli* O157: H7) and the infective dose of strain 107. As a result, while the preventive effect of strain 107 was 91%, the therapeutic effect was 84%.

Findings obtained from the study showed that strains that can hydrolyze gluten and have many basic probiotic properties have the potential to be used as probiotic supplements for individuals with CD.

Keywords: Lactic acid bacteria, Probiotics, Celiac, Gluten hydrolysis, Gliadin hydrolysis, *Galleria mellonella*

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	4
2.1. Laktik Asit Bakterileri (LAB).....	4
2.2. LAB'ların Probiyotik Özellikleri.....	9
2.3. Gluten ve Çölyak Hastalığı.....	15
2.4. Gluten ve gliadin degradasyonu yapan LAB'lar.....	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1. Materyal.....	21
3.1.1. Ekşi maya, hamur ve un örnekleri.....	21
3.1.2. Gluten.....	21
3.1.3. Gliadin.....	21
3.1.4. Antimikrobiyal aktivite çalışmasında indikatör olarak kullanılan mikroorganizmalar..	22
3.1.5. <i>G. mellonella</i> (Bal güvesi) larvası.....	23
3.1.6. Çalışmada kullanılan besiyerleri	24
3.1.6.1. <u>MRS Agar (Lactobacillus Agar acc. to De Man, Rogosa and Sharpe)</u>	24
3.1.6.2. <u>MRS Broth (Lactobacillus Broth acc. to De Man Rogosa and Sharpe)</u>	24
3.1.6.3. <u>Nutrient Agar (NA)</u>	25
3.1.6.4. <u>Nutrient Broth (NB)</u>	25
3.1.6.5. <u>M17 Agar (acc. to Terzaghi)</u>	26
3.1.6.6. <u>Gluten Agar-1 (GA-1)</u>	26
3.1.6.7. <u>Gluten Broth-1 (GB-1)</u>	27
3.1.6.8. <u>Gluten Broth -2 (GB-2)</u>	27
3.1.6.9. <u>Gluten Agar-2 (GA-2)</u>	27

İÇİNDEKİLER (devam)

3.1.6.10. <u>Gliadin Glukoz Broth (GGB)</u>	28
3.1.6.11. <u>Gliadin Glukoz Agar (GGA)</u>	28
3.1.6.12. <u>Mueller-Hinton Agar (MHA)</u>	29
3.1.6.13. <u>Mueller-Hinton Broth (MHB)</u>	29
3.1.6.14. <u>Malt Ekstrakt Agar (MEA)</u>	29
3.1.6.15. <u>Malt Ekstrakt Broth (MEB)</u>	30
3.1.6.16. <u>Kazein Agar</u>	30
3.1.6.17. <u>Jelatin Agar</u>	30
3.1.6.18. <u>Sporulasyon besiyeri</u>	31
3.1.6.19. <u>Skim milk agar</u>	31
3.1.6.20. <u>Safra tuzuna direnç çalışması için çift kuvvetli MRS Broth ortamı</u>	31
3.1.6.21. <u>MRS Broth (pH1, pH2, pH3 ve pH4)</u>	31
3.1.6.22. <u>%0,3 Safra tuzu (Ox bile) içeren çift kuvvetli MRS Broth ortamı</u>	32
3.1.6.23. <u>%0,6 Safra tuzu (Ox-bile) içeren çift kuvvetli MRS Broth ortamı</u>	32
3.1.6.24. <u>G. mellonella (Bal güvesi) larvası sentetik besini</u>	32
3.1.7. Çalışmada kullanılan çözeltiler ve boyalar.....	32
3.1.7.1. <u>Serum fizyolojik (SF)</u>	32
3.1.7.2. <u>%20'lik gliserol çözeltisi</u>	33
3.1.7.3. <u>NaOH ve HCl çözeltisi</u>	33
3.1.7.4. <u>%3'lük H₂O₂ çözeltisi</u>	33
3.1.7.5. <u>Fosfat üre magnezyum sülfat (PUM) tamponu (pH: 7.1)</u>	33
3.1.7.6. <u>Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) (pH: 7.2)</u>	33
3.1.7.7. <u>50 mM Tris-HCl (pH8.0)</u>	34
3.1.7.8. <u>Protein boyama çözeltisi</u>	34
3.1.7.9. <u>Boya uzaklaştırma çözeltisi</u>	34
3.1.7.10. <u>Kristal viyole</u>	34
3.1.7.11. <u>Lugol</u>	34
3.1.7.12. <u>Safranin</u>	34
3.1.7.13. <u>Malaşit yeşili</u>	35
3.1.7.14. <u>Yapay mide sıvısı pH2</u>	35
3.1.7.15. <u>Yapay mide sıvısı pH3</u>	35
3.1.8. Çalışmada kullanılan cihazlar.....	35
3.2. Yöntem.....	37

İÇİNDEKİLER (devam)

3.2.1. Kızıltan ve Siyez unundan ekşi maya yapımı	39
3.2.2. Un, ekşi maya ve hamur örneklerinden mikroorganizma izolasyonu, saflaştırma ve saf kültürlerin stoklanması.....	39
3.2.3. GA-1 besiyeri kullanılarak suşların gluten hidrolize etme yeteneğinin belirlenmesi	41
3.2.4. Gluten hidrolize etme yeteneği belirlenen suşlardan LAB olanlarının seçimi	42
3.2.4.1. <u>Katalaz testi</u>	42
3.2.4.2. <u>Spor oluşturma</u>	42
3.2.4.3. <u>Hareketlilik testi</u>	43
3.2.5. GA-1 ve GA-2 besiyerlerinde LAB suşlarının gluten hidroliz yeteneklerinin onaylanması.....	43
3.2.6. Gliadin hidrolizi.....	45
3.2.7. Gluten hidrolize eden 39 LAB suşunun probiyotik niteliklerinin belirlenmesi.....	46
3.2.7.1. <u>Düşük pH'larda canlı kalma yetenekleri</u>	46
3.2.7.2. <u>Safrada canlı kalma yetenekleri</u>	46
3.2.7.3. <u>Yapay mide sıvısında canlı kalma</u>	47
3.2.7.4. <u>Otoagregasyon yetenekleri</u>	47
3.2.7.5. <u>Hidrofobisite yetenekleri</u>	48
3.2.7.6. <u>LAB'ların antimikrobiyal aktivitesi</u>	49
3.2.7.7. <u>LAB'ların proteolitik özelliklerinin belirlenmesi</u>	49
3.2.7.8. <u>Glukozdan gaz üretimi</u>	50
3.2.8. Gluten hidrolizi için optimum koşulların belirlenmesi.....	51
3.2.8.1. <u>Aerobik ve anaerobik koşullarda gluten hidrolizi</u>	51
3.2.8.2. <u>Farklı pH düzeylerinde gluten hidrolizi</u>	51
3.2.9. Seçilen suşlar ile Enzim Bağlı İmmüno-sorbent (ELISA) test kiti kullanılarak 33-mer peptid degradasyonunun belirlenmesi	52
3.2.10. <i>G. mellonella</i> larvaları <i>in vivo</i> enfeksiyon denemesi.....	53
3.2.10.1. <u><i>G. mellonella</i></u>	54
3.2.10.2. <u><i>G. mellonella</i> ile seçilen 107 nolu suşun enfeksiyon testi için doz çalışması</u>	57
3.2.10.3. <u>107 nolu suş ile <i>G. mellonella</i> üzerine tedavi edici ve koruyucu etki çalışması</u> ..	59
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	61
4.1. Un, ekşi maya ve hamur örneklerinden mikroorganizma izolasyonu, saflaştırması ve saf kültürlerin stoklanması.....	61
4.2. GA-1 besiyeri kullanarak suşların gluten hidrolize etme yeteneğinin belirlenmesi	61

İÇİNDEKİLER (devam)

4.3. Gluten hidrolize etme yeteneği belirlenen suşlardan LAB olanlarının seçimi	62
4.4. GA-1 ve GA-2 besiyerinde LAB suşlarının gluten hidroliz yeteneklerinin onaylanması	69
4.5. Seçilen suşlarla Gliadin hidrolizi testi	72
4.6. Gluten hidrolize eden 39 LAB suşunun probiyotik niteliklerinin belirlenmesi.....	73
4.6.1. Düşük pH’larda canlı kalma yetenekleri	73
4.6.2. Safrada canlı kalma yetenekleri	78
4.6.3. Yapay mide sıvısında canlı kalma	81
4.6.4. Otoagregasyon yetenekleri	84
4.6.5. Hidrofobisite kapasiteleri.....	86
4.6.6. LAB’ların antimikrobiyal aktivitesi.....	88
4.6.7. LAB’ların proteolitik özelliklerinin belirlenmesi	89
4.6.8. Glukozdan gaz üretimi.....	90
4.7. Gluten hidrolizi için optimum koşulların belirlenmesi	93
4.7.1. Aerobik ve anaerobik koşullarda gluten hidrolizi.....	92
4.7.2. Gluten besiyerinde farklı pH ortamında üreme yetenekleri.....	92
4.8. Seçilen suşlarla ELISA test kitleri kullanılarak 33-mer peptid degradasyonunun belirlenmesi	109
4.9. Probiyotik nitelikleri ve gluten hidroliz yeteneği açısından seçilen suş ile yapılan <i>in vivo</i> enfeksiyon denemeleri	111
4.9.1. <i>G.mellonella</i> üzerine 107 nolu suşun enfektif dozunun belirlenmesi	111
4.9.2. <i>G. mellonella</i> üzerine tedavi edici ve koruyucu etki çalışması.....	113
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	118
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	118

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1	LAB'ların antimikrobiyal aktivitesi.....6
2.2	Probiyotik olma kriterleri.....11
2.3	Sağlıklı bir bireyin ince bağırsak epitel dokusu ve villuslar.....17
3.1	Gluten hidrolize etme yeteneğine sahip suşların seçimi ve bunların probiyotik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmaların akışı.....38
3.2	<i>G. mellonella</i>54
3.3	<i>G. mellonella</i> ergin bireyler ve yumurta bırakması için kullanılan içi boş siyah petek.....55
3.4	<i>G. mellonella</i> larvası için önerilen sentetik besin.....55
3.5	<i>G. mellonella</i> son evre larvaları.....56
3.6	Cam petrilere gruplar halinde ayrılan <i>G. mellonella</i> larvaları.....57
3.7	<i>G. mellonella</i> larvası prolegleri ve %70'lik etil alkol ile steril edilmesi.....58
3.8	Steril edilen <i>G. mellonella</i> larvası enjeksiyon işlemi.....58
4.1	LAB suşlarının GA-1 besiyerinde oluşturdukları zonlar.....71
4.2	LAB suşlarının GA-2 besiyerinde oluşturdukları zonlar.....71
4.3	Seçilen 12 LAB suşunun GGA besiyerinde oluşturdukları zonlar.....72
4.4	23 no.lu LAB suşunun pH3'teki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği.....95
4.5	23 no.lu LAB suşunun pH4'teki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği.....95
4.6	23 no.lu LAB suşunun pH5'teki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği96
4.7	23 no.lu LAB suşunun pH6'daki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği96
4.8	23 no.lu LAB suşunun pH7'deki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği97
4.9.	23 no.lu LAB suşunun pH8'deki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği97
4.10	24 no.lu LAB suşunun pH3'teki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği..... 98

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.11 24 no.lu LAB suşunun pH4'deki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği	98
4.12 24 no.lu LAB suşunun pH5'teki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği	99
4.13 24 no.lu LAB suşunun pH6'daki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği	99
4.14 24 no.lu LAB suşunun pH7'deki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği	100
4.15 24 no.lu LAB suşunun pH8'deki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği	100
4.16 68 no.lu LAB suşunun pH3'teki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği	101
4.17 68 no.lu LAB suşunun pH4'deki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği	101
4.18 68 no.lu LAB suşunun pH5'teki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği.....	102
4.19 68 no.lu LAB suşunun pH6'daki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği	102
4.20 68 no.lu LAB suşunun pH7'deki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği	103
4.21 68 no.lu LAB suşunun pH8'deki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği	103
4.22 107 no.lu LAB suşunun pH3'teki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği	104
4.23 107 no.lu LAB suşunun pH4'deki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği	104
4.24 107 no.lu LAB suşunun pH5'teki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği	105

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.25	107 no.lu LAB suşunun pH6'daki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği105
4.26	107 no.lu LAB suşunun pH7'deki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği106
4.27	107 no.lu LAB suşunun pH8'deki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği106
4.28	23 no.lu LAB suşunun pH3 canlı hücre sayımı-zon grafiği107
4.29	23 no.lu LAB suşunun pH4 canlı hücre sayımı-zon grafiği108
4.30	107 no.lu LAB suşunun pH3 canlı hücre sayımı-zon grafiği108
4.31	107 no.lu LAB suşunun pH4 canlı hücre sayımı-zon grafiği..... 109
4.32	38P ve 107 no.lu suşların, kızılta unundaki 33-mer peptid degradasyonunun AgraQuant® Gluten G12 kiti ile belirlenmesi110
4.33	<i>G. mellonella</i> larvaları113

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar.....	10
2.2 ÇH'nin klinik belirtileri.....	16
3.1 İzolasyon için kullanılan örnekler ve temin edildikleri yerler.....	21
3.2 Test mikroorganizmaları	22
3.3 Tez çalışmasında kullanılan cihazlar.....	36
3.4 İzolasyon için kullanılan örneklerin hazırlanışı.....	40
4.1 Un, ekşi maya ve hamur örneklerinden izole edilen gram pozitif bakteriler, mayalar ve önceki çalışmalarda peynirden izole edilmiş LAB'nin GA-1 besiyerinde gluten hidrolize etme yetenekleri.....	62
4.2 Ticari (Dr. Qetker) ekşi kuru hamur mayasından izole edilen bakterilerin morfolojisi, aerobik/anaerobik üreme yeteneği ve katalaz testi sonuçları	63
4.3 Ekşi mayadan (Fethiye) izole edilen bakterilerin morfolojisi, aerobik/anaerobik üreme yeteneği ve katalaz testi sonuçları	64
4.4 Ekşi mayadan (Siyez unu) izole edilen bakterilerin morfolojisi, aerobik/anaerobik üreme yeteneği ve katalaz testi sonuçları	65
4.5 Ekşi mayadan (Kızıltan unu) izole edilen bakterinin morfolojisi, aerobik/anaerobik üreme yeteneği ve katalaz testi sonuçları	65
4.6 Kızıltan unundan izole edilen bakterilerin morfolojisi, aerobik/anaerobik üreme yeteneği ve katalaz testi sonuçları	65
4.7 Siyez unundan izole edilen bakterilerin morfolojisi, aerobik/anaerobik üreme yeteneği ve katalaz testi sonuçları	66
4.8 Hamurdan izole edilen bakterilerin morfolojisi, aerobik/anaerobik üreme yeteneği ve katalaz testi sonuçları.....	67

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.9	Katalaz negatif 39 bakteri suşunun hareketlilik ve sporulasyon test sonuçları 67
4.10	39 LAB suşunun GA-1 ve GA-2 besiyerlerinde gluten hidrolizi69
4.11	İzolasyonda elde edilen 39 LAB suşunun pH1 ve pH2 de canlı kalma yetenekleri74
4.12	İzolasyonda elde edilen 39 LAB suşunun pH3 ve pH4 de canlı kalma yetenekler76
4.13	İzolasyonda elde edilen 39 LAB suşunun %0,3 ve %0,6 oranında safra bulunan bir ortamda canlı kalma yetenekleri..... 79
4.14	İzolasyonda elde edilen 39 LAB suşunun yapay mide sıvısı pH2 ve mide sıvısı pH3 ortamında canlı kalabilme yetenekleri82
4.15	12 LAB suşunun otoagregasyon yetenekleri84
4.16	12 LAB suşunun hidrofobisite kapasitesi86
4.17	6 tane LAB suşunun antimikrobiyal aktivitesi88
4.18	İzole edilen 39 LAB suşunun skim milk hidrolizi, kazein hidrolizi, jelatin hidrolizi ve glukozdan gaz üretebilme özellikleri91
4.19	Gluten varlığında aerobik ve anaerobik koşullarda üreme zon çapları (mm) ..94
4.20	Probiyotik özellikleri ve gluten hidroliz yeteneği dikkate alınarak seçilen 38 ve 107 nolu suşların, kızılta unundaki 33-mer peptidleri degradasyon yeteneğinin Agraquant ELISA test kiti ile belirlenmesi110
4.21	<i>G. mellonella</i> larvası üzerine <i>E.coli</i> O157:H7 ve 107 no.lu LAB suşunun enfektif dozlarının belirlenmesi..... 112
4.22	<i>G. mellonella</i> larvası ile tedavi edici ve koruyucu etki çalışması.....114

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
abs	Absorbans
C	Santigrat derece
CO ₂	Karbondioksit
dk	Dakika
g	Gram
HCl	Hidroklorik asit
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
KI	Potasyum iyodür
kob	Koloni oluşturan birim
L	Litre
mm	Milimetre
ml	Mililitre
M	Molar
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
NaOH	Sodyum hidroksit
O ₂	Oksijen
OD	Optik dansite
rpm	Dakikadaki devir sayısı
sn	Saniye
v/v	Hacim/hacim
w/v	Ağırlık/hacim

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**Kısaltmalar**

ÇH

ÇH-LAB

FAO

FDA

LAB

No

WHO

IPW

Açıklama

Çölyak Hastası

Gluten Hidrolize Eden Laktik Asit Bakterisi

Gıda ve Tarım Örgütü

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

Laktik asit bakterisi

Numara

Dünya Sağlık Örgütü

Uluslararası Probiyotik Çalıştayı

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Laktik asit bakterileri “probiyotik” olarak kullanılan mikroorganizmaların arasında çok önemli bir yere sahiptir (Yılmaz, 2020). Probiyotikler, yeterli miktarda diyet ile birlikte kullanıldığında sağlığa yarar sağlayan canlı mikroorganizmalardır (Bajaj vd., 2020).

Avrupalı bilim insanları “Probiyotik” kelimesini “Vücuda alındığında konak canlının sindirim sistemi mikrobiyotasına olumlu yönde etki eden canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlamışlardır (Çakır ve Çakmakçı, 2004).

Salminen vd. (1998) probiyotik tanımını “Probiyotikler, insan ve hayvanların sağlığına yarar sağlamak üzere tasarlanan gıda, yem ya da besinsel katkı maddelerindeki canlı mikrobiyal preparatlardır” biçiminde değiştirmişlerdir.

Bağırsak sistemindeki fizyolojik denge; hastalık, stres, yaşlılık, ilaç kullanımı, antibiyotikler, diyet alışkanlıklarındaki değişiklikler, çevresel koşulların meydana getirdiği değişimler, iklimsel farklılıklar ve toksik maddeler gibi faktörlerden doğrudan ya da dolaylı olarak etkilenebilmektedir. Meydana gelen bu düzensizlikler “Disbiosis” olarak adlandırılmaktadır. Yararlı mikroorganizmaların bağırsak fizyolojisinin dengesine olumlu yöndeki katkısına ise “Probiosis” ve bu yararı sağlayan mikroorganizmalara ise “Probiyotik mikroorganizmalar” denilmektedir (Gürsoy ve Kınık, 2005).

Sindirim sistemindeki olumlu etkiyi gösteren mikroorganizmaların sayısı yeterli seviyede değil ise sağlıklı bir yaşam için kesinlikle dışarıdan takviye edilmelidir (Çakır ve Çakmakçı, 2004). Günümüzde her alanda kullanılan probiyotik özelliğe sahip mikroorganizmalar 1915 yılından beri bağırsak mikrobiyotasını düzenleyerek enfeksiyonları önlemek için kullanılmaktadır (Gürsoy ve Kınık, 2005). Dışarıdan takviye edilerek ağız yoluyla alınan probiyotik mikroorganizmaların faydasını gösterebilmeleri için çok sayıda olmaları ve bağırsak sistemine canlı bir şekilde ulaşabilmeleri gerekir. Mide ve bağırsaklarda sindirim süresi boyunca zarar görmeden canlılıklarını sürdürebilmeleri önemlidir (Güre, 2010).

Bir ince bağırsak hastalığı olan otoimmün karakterli ve besin kökenli olarak da bilinen Çölyak hastalığı (ÇH) ya da glutene duyarlı enteropati, insanlarda oldukça sık rastlanılan bir hastalıktır. Bu hastalığa sahip kişiler gluten içeren gıda ürünlerinin diyetlerine eklenmesi ile ince bağırsak yüzeyinde bulunan ve villus adı verilen parmaklı çıkıntılar bu gluten proteinlerine karşı oluşturduğu iltihabi bir reaksiyon sonrasında hasar görek yok olur ve işlevini yitirir. Böylece diyetle alınan diğer besinlerin emilim ve sindirimleri de bozularak malabsorpsiyon (kötü emilim) sendromu adı verilen hastalık tablosu ortaya çıkar. Demir, kalsiyum, folik asit ve yağda çözünen vitaminler gibi önemli besin maddelerinin de emilimi düşer (Katina vd., 2005).

Gluten kompleksi, buğdayda depo proteindir ve iki grup proteinden oluşmaktadır: Gliadin (prolamin) ve Glutenin (glutelin). Gluteninler seyreltik asit ve baz çözeltilerinde çözünen proteinler olarak bilinmektedir. Gliadinler ise %50-70'lik alkolde çözünebilir proteinlerdir (Biesiekierski, 2017; Shewry, 2019).

Günümüzde tüm glutene duyarlı enteropati hastalığı olan kişilerin glutensiz diyetle ömür boyu eksiksiz uyması ve bunu yaşam boyu sürdürmesi gerekmektedir. LAB'ların sahip oldukları proteolitik aktivitesi, çölyak hastalığı ya da glutene duyarlı enteropati de etkili olan gluten kaynaklı belirli alerjen bileşenlerin azalmasında bir araç olarak kabul edilebilir (Rollán vd., 2005).

Pek çok ÇH, hem sosyal hem de duygusal faktörler yoluyla diyet tedavisini sürdürmekte güçlük çekmektedir. Bu nedenle probiyotik takviyesi gibi yeni tedavi seçenekleri geniş çapta incelenmiştir (Bakshi vd., 2012).

Bu bağlamda, probiyotik takviyesi, yararlı ve patojen mikroorganizmalar (disbiyozis) arasındaki dengesizliği düzeltebilir ve bağırsak iyileşmesini destekleyebilir (Coqueiro vd., 2017). Dahası, bazı probiyotik suşlar gluten peptitlerini sindirerek daha az toksik hale getirir. Bu, ÇH'nin gluten tüketiminin etkisini azaltabilir ve glutensiz gıda üretimini destekleyebilir (Greco vd., 2011).

ÇH'nin hayvan modellerinden elde edilen sonuçlar, probiyotik bakterilerin farklı etki mekanizmaları ile hastalık patolojisi üzerinde olumlu etkileri olduğunu göstermiştir (Chander vd., 2018).

Ayrıca, probiyotik bakterilerin konakçı sağlığı üzerindeki olumlu etkileri türe, hatta suşa özgüdür (Hawrelak, 2003; Salminen ve Gueimonde, 2004). Başka bir deyişle, her bir LAB suşunun probiyotik özellikleri açısından benzersiz olduğu söylenebilir. Literatürlerden edinilen bilgiler ışığında bu çalışmada çeşitli un, ekşi maya, hamur ve peynirlerden izole edilen bakteri suşlarının öncelikle gluten hidrolize etme yetenekleri belirlenmiş, daha sonra bunların probiyotik özellikleri araştırılmıştır.

Bu çalışma sonucunda elde edilecek gluten hidrolize edebilen ve probiyotik nitelikleri taşıyan suşlar, tek başına ya da kombine edilerek, gluten duyarlılığı olan bireyler için probiyotik takviye amaçlı olarak kullanılabilir. Ayrıca bu suşlar ile saf ya da karışık “ekşi maya” preparatları hazırlanabilir ve bunlar glutensiz/gluteni azaltılmış fırın ürünleri üretiminde kullanılabilir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Laktik Asit Bakterileri (LAB)

LAB, fermentasyon sonucu son ürün olarak laktik asit oluşturan gram pozitif, hareketsiz, spor oluşturmeyen, basil, kok ve koko-basil morfolojiye sahip, katalaz negatif, aerotolerant, aside dayanıklı, nitratı indirgemeyen gruptur (Çon ve Gökalp, 2000; Evren vd., 2011). LAB grubu içinde yer alan cinsler *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus*, *Weissella*, *Vagococcus* ve *Aerococcus* olarak sıralanabilir (Axelsson, 1993; Stiles vd., 1997; Bilgin, 2008; Dinçer vd., 2009). LAB'lar, doğada yaygın olmaları, çeşitli gıda ve gıda maddelerinde sık rastlanan bozulmalara sebep olmaları ve bazı gıdaların üretim, olgunlaştırılma süreçlerinde önemli katkılar sağladıkları için gıda teknolojisinde büyük önem taşımaktadır (Çon ve Gökalp, 2000). *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri* ve *L. reuteri* gibi *Lactobacillus* suşları gıda ürünlerinde probiyotik olarak kullanılan LAB'lardır (Kalkan, 2016).

Yapılan birçok farklı çalışmada, LAB'ların ürettiği bazı metabolitlerin, çeşitli patojenlerin gelişimlerine etki gösterdiği ve biyofilm oluşturmalarını inhibe ettikleri belirtilmiştir (Ouweland vd., 2013; Nakatsuji vd., 2017).

Metabolitlerin içerisindeki organik asitler; laktik asit, formik asit, asetik asit, fenil laktik asit, propiyonik asit ve kaproik asittir. Bu asitler hücre zarındaki yağı çözerek hücrenin içerisine işleyerek, hücre içinin normalde nötr olan pH'sını düşürüp hücre inaktivasyonuna yol açtığı bilinmektedir (Wieland vd., 2002; Welman ve Maddox, 2003).

LAB'ların metabolitleri arasında yer alan hidrojen peroksit (H_2O_2); katalaz enzimi ile parçalanırken, LAB'lar katalaz negatif olduğundan dolayı parçalanmadan kalmaktadır. Bu avantaj sayesinde, LAB'ların diğer mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisi olmaktadır (Ramos vd., 2012). Hidrojen peroksit, bakterilerin hücre proteinlerindeki ve hücre zarındaki lipidlerin sülfidril gruplarını okside etmektedir. Bu oksidasyon aktivitesi, H_2O_2 'ye bakterisidal etki etme avantajı sağlamaktadır.

Yapılan çalışmalarda, H_2O_2 üreten bakterilerin, ortamdaki oksijeni kullanarak aerobik bir ortamı anaerobik ortama çevirerek gelişmek için oksijene ihtiyaç duyan mikroorganizmaların hücre zarı geçirgenlik işlevlerini bozarak antimikrobiyal etki gösterdiği belirtilmiştir (Lukic vd., 2018).

LAB'lar tarafından üretilen karbondioksit (CO_2); düşük konsantrasyonlarda bazı mikroorganizmaların gelişimine katkı sağlarken, yüksek konsantrasyonlarda ise engelleyici etki göstermektedir (Prince vd., 2012).

LAB'ların ürettiği bazı düşük molekül ağırlıklı bileşikler; düşük pH değerlerinde aktif olup, ısıya dayanıklı olması, geniş etki aralığına sahip olmaları ve asetonda çözünebilmeleri gibi çeşitli özelliklere sahiptir. Bu sahip oldukları özellikler bazı patojen bakterilere karşı antimikrobiyal etki göstermektedir (Wang vd., 2011).

LAB'ların gıda endüstrisinde genellikle starter kültür olarak kullanıldığı bilinmektedir. LAB'lar tarafından üretilen toksik olmayan ve diğer istenmeyen yan etkileri olmadan hedef gıda patojenlerine karşı gıdaların güvenliğinin sağlanmasında rol oynayan antimikrobiyal peptidlerin (bakteriyosinler) önemi giderek artmaktadır (Cleveland vd., 2001).

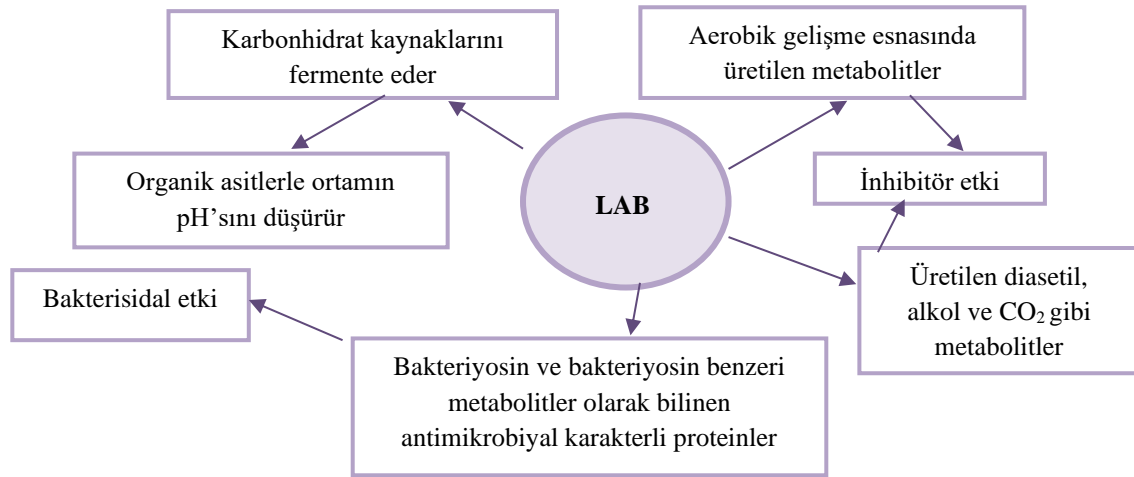
İnsanlarda ve hayvanlarda sık ve yanlış ilaç kullanımı sonucu hastalığa neden olan patojenlerin artışı bakteriyosinleri yalnızca gıda koruma amaçlı kullanımının dışına taşımaktadır. Çoklu ilaç direncine sahip patojen bakterilerin artışından kaynaklı insan ve hayvanlarda sebep oldukları enfeksiyonların tedavi edilerek önlenmesine alternatif bir antimikrobiyal ajan olmaları konusunda çalışmalar vardır. Yapılan bu çalışmalar ışığında birçok bilim insanı da bakteriyosinleri, tıbbi ve kişisel bakım ürünlerinde kullanım amacına yönelik çalışmaktadır (Yan vd., 2020).

Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler, dar spektrumlu peptidler ya da antimikrobiyal proteinlerdir. Bakteriyosinlerin ribozomal olarak sentezlenmesi, antibiyotiklerin ise çoklu enzim kompleksleri ile sekonder metabolit olarak sentezlenmesi ikisini birbirinden ayıran en önemli özelliktir denmektedir (Abanoz, 2014; Karaman vd., 2020).

Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler;

- Fermente gıda ürünleri ve yem üretiminde ticari öneme sahip olması ve kullanım açısından güvenli kabul edilmesi (GRAS), ökaryotik hücrelerde toksik özelliğe sahip olmaması,
- Gıda kaynaklı patojen bakteriler de dahil olmak üzere tek bir patojen bakteriye yönelik aktivite göstermeleri ve antimikrobiyal etki aralıklarının Gram negatif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlere göre daha geniş olması, sebepleri ile çok daha büyük bir öneme sahiptir (Nes vd., 2007).

LAB'ların test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivite göstermesi Şekil 2.1'de verilen mekanizmalar ile gerçekleşmektedir.



Şekil 2.1 LAB'ların antimikrobiyal aktivite mekanizması (Yılmaz, 2020)

Enterokoklar; tek, ikili ve kısa zincirler halinde bulunan kokobasil şeklinde morfolojik yapıya sahip, genellikle katalaz negatif, Gram pozitif bakterilerdir. İnsan ve hayvan bağırsak florasının bir parçasıdır. Enterokoklarla yapılan çalışmalarda ürettikleri bakteriyosinlerle birden çok patojen mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal etki gösterdikleri belirtilmiştir (Bhola ve Bhadekar, 2019).

Leuconostoc cinsi bakteriler; genellikle çift ya da zincir oluştururlar. Katalaz negatif, fakültatif anaerop ve hareketsiz Gram pozitif bakterilerdir. Koloni morfolojileri yuvarlak şekilli ve gri-beyaz renktedir.

Sentez sırasında açığa çıkardıkları dekstranlar gıda sanayisinde emülgatör olarak kullanılmaktadır. Ayrıca kıvam arttırıcı özelliklerinde de yararlanılmaktadır. *L. mesenteroides* türü fermente ürünlerden izole edilmektedir (Gan vd., 2019).

Pediococcus cinsi bakteriler; çift halde ya da tetrat formunda bulunurlar. Katalaz negatif ve hareketsiz Gram pozitif bakterilerdir. *Pediococcus* cinsi içerisinde yer alan türler fermentasyonda starter kültür olarak kullanılmaktadır. Bazı *Pediococcus* cinsi bakteriler “pediyosin” adı verilen bakteriyosin üretmektedir. Ayrıca, *Pediacocci* türlerinin biyokoruyucu olarak gıda üretimi alanında kullanıldığı bilinmektedir. *Pediococcus* cinsi içerisinde yer alan *P. parvulus* türü, sütün fermentasyonunda ve peynir yapımında kullanımlarından ötürü, süt ve süt ürünlerinden izolasyon ile elde edilmeleri mümkündür (Yılmaz, 2020).

Lactococcus cinsi bakteriler; yuvarlak veya oval morfolojik yapıya sahiptirler. Katalaz negatif, hareketsiz ve spor oluşturmeyen Gram pozitif, mezofilik karaktere sahip bakterilerdir. En yaygın türü olan *L. lactis* süt ürünlerinde starter kültür olarak kullanılmaktadır. Fermentasyon sırasında ürettikleri bakteriyosinler patojenler üzerinde inhibe edici bir etkiye sahiptir (Mills vd., 2011).

Laktobasiller; çubuk veya koko-basil morfolojiye sahiptir. Spor oluşturmazlar. Katalaz negatif Gram pozitif bakterilerdir. Laktobasil cinsi bakteriler, insanların ve hayvanların mukozal membranlarından izole edilebilirler. Ayrıca fermente süt ürünleri ve et gibi gıdalardan da izolasyonları yapılabilmektedir. *Lactobacillus* cinsi; *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum* ve *L. reuteri* gibi bakteri türlerini içerir (Yılmaz, 2020).

L. delbrueckii; çubuk şeklinde ve hareketsiz bakterilerdir. Katalaz negatif, laktik asit üretebilen Gram pozitif bakterilerdir. Yoğurda lezzetini veren, kıvam özelliklerini kazandıran bir bakteridir. Starter kültür olarak kullanılmaktadır. Bazı çalışmalar, test mikroorganizmalarına karşı antibakteriyel özelliğe sahip olduklarını belirtmiştir (Shokryazdan vd., 2014).

L. acidophilus; çubuk şeklinde ve uçları yuvarlak kenarları pürüzlü morfolojik özelliğe sahip bir bakteridir. Anaerob ya da fakültatif anaerobtur.

Hareketsiz ve katalaz negatif Gram pozitifdir. Termofilik özelliği bulunmaktadır. Laktoz fermentasyonu bakımından homofermentatiftir (Ahmed vd., 2010).

L. casei; fakültatif anaerobtur. Spor oluşturmaz. Hareketsizdir. Koloni morfolojisi olarak yuvarlak şekle sahip bir bakteridir. Özellikle süt endüstrisinde rol oynar. Fermentatif metabolizma sırasında metabolik son ürün olarak laktik asit açığa çıkarır (Lukic vd., 2018).

L. paracasei; çubuk şeklindeki bu bakteri, spor oluşturmaz. Gram pozitifdir. Fakültatif heterofermentatif özelliğe sahiptir. Bakteriyosin, ekzopolisakkarit ve aroma maddeleri oluşturma yetenekleri vardır. Bu yetenekleri sayesinde starter kültür olarak kullanılabilir. Genellikle insan bağırsak sisteminde normal floranın bir parçası olarak bulunmaktadır. İzole edildikleri yerler genellikle fermente süt, et ve sebzelerdir (Lavermicocca vd., 2015).

L. rhamnosus; katalaz negatif, spor oluşturmaz, hareketsiz Gram pozitif bir bakteridir. Kısa zincirler şeklinde görünür. Fakültatif heterofermentatif özelliğe sahiptir. Pentozları ve glukogonları fermente edebilmektedir. Ekstraselüler polisakkarit üretme yeteneklerini vardır. Başta vajina ve bağırsak sistemi olmak üzere birçok farklı yerden izole edilmiş farklı suşları vardır. Süt ve süt ürünleri gibi fermente gıdalarda starter kültür olarak kullanılmaktadır (Al-Malkey vd., 2017).

L. plantarum; çubuk şeklinde, tek, çift ya da kısa zincirler halinde bulunur. Hareketli Gram pozitif bir bakteridir. Koloni morfolojisi rengi; beyaz, açık sarı ya da koyu sarı olabilmektedir. Süt ve süt ürünleri, fermente bitkiler, insan ağız ve sindirim sistemi gibi farklı yerlerden izole edilebilir (Gan vd., 2019).

L. reuteri; çubuk şeklindeki bu bakteri, anaerobik, katalaz negatif Gram pozitifdir. İnsan, domuz, tavuk ve fare başta olmak üzere farklı canlı gruplarının bağırsaklarında yer alırlar. İzole edildikleri bir başka yer ise fermente süt ürünleri ve insan sütüdür (Ahl vd., 2016).

L. coryniformis; çubuk şeklinde morfolojik bir yapıya sahiptir. Katalaz negatif ve oksidaz negatif Gram pozitif bir bakteridir. Fermente süt ürünlerinden ve sebzelerden izole edilebilir olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur.

Ayrıca ürettiği çeşitli antifungal bileşiklerin farklı patojenlere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu da belirtilmiştir (Slavica vd., 2015).

LAB'lar tarafından üretilen bazı EPS'lerin, insan sağlığına katkıda bulunduğunu ve antitümör, antibiofilm, antioksidan ve kolesterol düşürücü etkileri olduğunu da yapılan çalışmalar ile tespit edilmiştir (Alp ve Ertürkmen, 2019).

2.2. LAB'ların Probiyotik Özellikleri

LAB grupları bazıları probiyotik özellikler de göstermektedir. Probiyotikler, bağırsak sisteminin mikrobiyal dengesini düzenlemeye yardımcı olarak konakçı sağlığı üzerinde yararlı etkilere sahip olan, canlı mikrobiyal gıda katkılarıdır (Gülbandılar vd., 2017). Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization: WHO) uzmanları 2001 yılında probiyotikleri “gıdanın bir parçası olarak yeterli sayıda tüketildiğinde konakçının sağlığı üzerinde olumlu etkide bulunan canlı mikroorganizma” olarak tanımlanmıştır (Gülbandılar vd., 2017). Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar Çizelge 2.1’ de verilmiştir. Probiyotik olarak kullanılan birçok bakteri LAB’dır.

Probiyotiklerin, vücutta etkili olabilmeleri için en az hangi konsantrasyonda alınmaları gerektiği ile ilgili bilgiler henüz tam olarak netleşmemiş olsa da, genellikle probiyotik bakterilerin probiyotik bir ürün içerisinde en az 10^6 - 10^7 kob/g-ml düzeyinde bulunması gerekmektedir. Probiyotik bir etkinin oluşması için günlük olarak yaklaşık 10^6 - 10^9 kob/g-ml miktarında probiyotik alınması gerektiği kabul edilmektedir (Bilginer ve Çetin, 2019).

Çizelge 2.1 Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar (Ceyhan ve Alıç, 2012; Kumar vd., 2017)

Mikroorganizma Grubu ya da Cinsi	Tür
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus lactis</i> <i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> * <i>Lactobacillus amylovorus</i> * <i>Lactobacillus brevis</i> * <i>Lactobacillus reuteri</i> * <i>Lactobacillus casei</i> * <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> * <i>Lactobacillus plantarum</i> * <i>Lactobacillus farmicinis</i> * <i>Lactobacillus rhamnosus</i> * <i>Lactobacillus salivarius</i> <i>Lactobacillus gasseri</i> <i>Lactobacillus johnsonii</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> * <i>Bifidobacterium breve</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium longum</i> * <i>Bifidobacterium pseudolongum</i> * <i>Bifidobacterium thermophilum</i> * <i>Bifidobacterium lactis</i> *
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> * <i>Enterococcus faecium</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> * <i>Bacillus pumilis</i> <i>Bacillus lentus</i> <i>Bacillus licheniformis</i> * <i>Bacillus coagulans</i> <i>Bacillus cereus</i> *
<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus cerevisiae</i> <i>Pediococcus acidilactici</i> * <i>Pediococcus pentoseceus</i> *
<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus cremoris</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Streptococcus intermedius</i> <i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus diacetylactis</i> <i>Streptococcus infantarius</i> * <i>Streptococcus salivarius</i> *

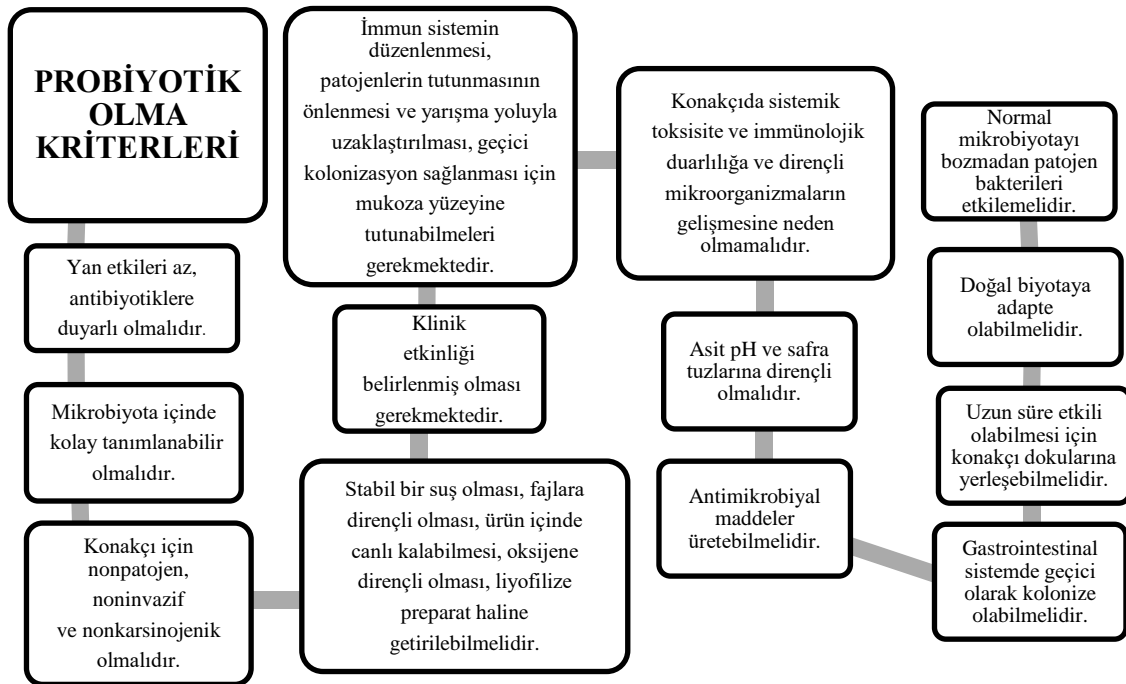
* Hayvan sağlığında kullanılan probiyotik türleri

Çizelge 2.1 Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar (devam) (Ceyhan ve Alıç, 2012; Kumar vd., 2017)

Mikroorganizma Grubu ya da Cinsi	Tür
<i>Bacteriodes</i>	<i>Bacteriodes capillus</i> <i>Bacteriodes juis</i> <i>Bacteriodes ruminicola</i> <i>Bacteriodes amylophilus</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> * <i>Leuconostoc citreum</i> * <i>Leuconostoc lactis</i> *
<i>Küfler: Aspergillus</i>	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i>
Mayalar	<i>Saccharomyce</i>

* Hayvan sağlığında kullanılan probiyotik türleri

Bir LAB'ın probiyotik olarak kabul edilebilmesi için bazı kriterlere sahip olması gerekir (Gülbandılar vd., 2017). Bu kriterler Laktik Asit Bakteri Endüstriyel Platformu (LABIP) tarafından belirtilmiştir (Yılmaz, 2020). Bu kriterler Şekil 2.2' de verilmiştir.



Şekil 2.2 Probiyotik olma kriterleri (Di Cerbo vd., 2016)

Probiyotiklerin asidik ortama dirençlerinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Burada amaç midenin pH değerinin 2,0 seviyelerinde olması ve bu mikroorganizmaların da bağırsağa ulaşmadan önce, mideden geçerken canlı kalabilme yeteneklerinin belirlenmesidir. Yapılan birçok çalışmada pH değeri 2,0 olan koşullar zaman zaman çok seçici bir ortam sağlasa da, pH değeri 3,0 olan koşullarda farklı bakterilerin gelişim gösterebildiği gözlenmiştir. Bu sebeptendir ki pH değeri 2,5 olan koşullar daha uygun ortam olarak belirlenmiş ve kültürlerin bu pH'daki canlı kalabilmeleri 0., 2. ve 4. saatler arasında takip edilmiştir (Dunne vd., 2001).

Sindirim sistemindeki antimikrobiyal etki mekanizmalarından bir diğeri ise safra tuzlarıdır. Safra asidi, karaciğerde kolesterolden sentezlenerek safra kesesinden konjuge formda on iki parmak bağırsağına gitmektedir. Bu asitler, genellikle mikrobiyal bir aktivite sonrasında kolonda kimyasal modifikasyonlara (dekonjügasyon, dehidroksilasyon, dehidrojenasyon ve deglukuronidasyon) uğramaktadır.

Bakterilerin büyük bir kısmı lipit ve yağ asidi içeren hücre zarına zarar vererek engelleyici bir etki yaratmaktadır. Konjuge ve dekonjuge safra asitleri *E. coli* suşları, *Klebsiella* spp. ve *Enterococcus* spp. üzerinde engelleyici etkiye sahiptir. Öte yandan dekonjuge formların çok daha engelleyici etkiye sahip olması ve gram pozitif bakterilerin gram negatif bakterilere göre daha hassas olduğu belirtilmiştir. Bilinen bu özellik, muhtemel probiyotik suşların bağırsakta bir işleve sahip olabilmesi için safraya karşı direnç göstermeleri gerekmektedir. Laboratuvar ortamında muhtemel probiyotik olduğu düşünülen mikroorganizmaların safra tuzlarına karşı direnci, genellikle kullanılan besiyeri içerisinde, %0,3, %0,5 ve %1 safra konsantrasyonlu ortamlarda bakteri sayısını belirli aralıklarla (0., 2. ve 4. saat) incelenerek tespit edilmektedir (Dunne vd., 2001).

İnsan vücudunda çeşitli biyolojik bariyerleri geçebilen probiyotik mikroorganizmaların, ince bağırsakta yüzey epitel hücrelerine tutunabilme yeteneğinde olmaları istenmektedir (Sourabh vd., 2011). Probiyotiklerin bağırsak mukozasına bağlanmasının mikrobiyal hücre yüzeyindeki bazı spesifik moleküler reseptörler arasında gerçekleştirilen elektrostatik etkileşim ve hidrofobik kuvvetler sayesinde olduğu belirtilmiştir.

Bağırsak epitelyum hücrelerine tutunabilme yeteneklerini belirlemek için hücre yüzey hidrofobisitesi yöntemi uygulanmaktadır (Solak, 2020).

Probiyotik olarak adlandırılacak mikroorganizmaların otoagregasyon aktivitelerini de bir diğer önemli ölçüttür. Otoagregasyon, aynı türdeki mikroorganizmaların arasındaki agregasyon olarak tanımlanmıştır. Otoagregasyon özelliğine sahip mikroorganizmaların devamlı bir arada olması sebebiyle gen transferi yapabildikleri ve genetik stabilitesi özelliklerini korudukları belirtilmiştir (Syal ve Vohra, 2013).

Probiyotik bakterilerin, sindirim sistemi hastalıkları tedavisinde beslenme ve düzenleyici özellikleri bulunmaktadır. Laktaz, maltaz, sükröz enzim aktivitesini arttırmaları, vitamin ve minerallerin emilimini kolaylaştırırlar. Bağışıklık sistemi üzerinde olumlu etkileri vardır (Gillor vd., 2008; Gültekin, 2004; Sağdıç vd., 2004). Probiyotik olan LAB'lar tıbbi alanlarda da kullanılmaktadır. Bu LAB'lar bağırsakta B vitaminlerini, β -galaktozidazı ve antimikrobiyal maddeleri salgıladıkları için çok yönlü etkiye sahiptirler. β -galaktozidaz enzimi sütteki laktozu metabolize edemeyen (laktoz-intolerant) insanların laktoz sindiriminde kolaylık sağlar. Probiyotik LAB'ların insan sağlığına faydalı etkileri aşağıda verilmiştir:

- Yüksek kolesterol seviyesini azaltılması,
- Laktoz intoleransının hafifletilmesi,
- Bağırsak mikrobiyotası üzerine olumlu etki,
- İntestinal sistem enfeksiyonlarının engellenmesi,
- İmmün sistemin güçlenmesi,
- İltihabi veya alerjik reaksiyonların azaltılması,
- Kolon kanseri riskinin azaltılması,
- Ürogenital enfeksiyonlar,
- *Helicobacter pylori* enfeksiyonu giderimi,
- Ağır metallerin ve mikotoksinlerin giderilmesi (Ceyhan ve Alıç, 2012).

Bu belirtilen faydalarının dışında probiyotiklerin anksiyete ve depresyon üzerindeki yararlı etkileri, zararlı bağırsak patojenlerinin dışlanması ve pro-inflamatuar süreçte azalmalar ile açıklanmaktadır (Akkaya ve Beyaz, 2018). Ayrıca multiple skleroz (MS) ve bağırsak mikrobiyomu incelendiğinde probiyotiklerin bağırsak mikrobiyota modülasyonu üzerine etkileri MS hastalığını tedavi etmek için yeni fırsatlar sunmaktadır.

Bazı probiyotiklerin immünomodülatör özellikleri, prebiyotikler,bakteriler ile ilişkili moleküller, MS hastaları için mevcut olan tedavi seçeneklerini tamamlayan koruyucu tedavileri geliştirmek için kullanılmaktadır (Barreiro vd., 2018).

Birçok çalışmada, migrenin karmaşık bir nörojenik inflamatuvar bozukluk olduğundan bahsedilmektedir. Migren ile ilişkili gastrointestinal bozuklukların tedavisinde olası probiyotiklerin çalışma mekanizmalarından biri de bağırsak bariyerinin güçlendirilmesidir. Migreni önlemek için beslenme tedavisinde probiyotiklerin kullanmasına ilişkin teori peptidlerin ve probiyotiklerin kombinasyonunun, çoğu hastada besin asimilasyonunu iyileştirmesine dayanmaktadır (Akkaya ve Beyaz, 2018).

Bifidobakterilere dayalı probiyotikler ise Alzheimer'lı bireylerde bilişsel, duyuşsal ve duygusal işlevleri iyileştirmektedir (Mancuso ve Santangelo, 2017).

Parkinson hastalığı açısından da probiyotikler; iyi mikrobiyata antioksidan özelliklere sahip vitaminler üretmede bu hastalık için yararlı etkiler oluşturmaktadır. Probiyotikler aşırı miktarlardaki serbest radikalleri sınırlayabilmekte ve Parkinson hastalığı gibi oksidatif stres ile ilişkili çeşitli hastalıkların seyrinin zayıflamasına neden olabilmektedirler (Akkaya ve Beyaz, 2018).

Probiyotiklerin insan vücuduna ve çeşitli sistemlerine yararlı etkisinin olduğu artık neredeyse tüm çalışmalarla ortaya koymuştur (Kırma, 2016). Fonksiyonel gıda geliştirme ve sağlık yarar ürünleri üretimi, gıda endüstrisinin ilgi çekici alanlarıdır. Son yıllarda, glutensiz gıda maddelerine ilgi artmaktadır.

Glutensiz ekmekler, makarnalar, erişte, kurabiye, karabuğday ve bira dahil olmak üzere pek çok glutensiz ürünler üretime alınmıştır. Bununla birlikte, bu ürünlerin besinsel kalitesinin göz önünde bulundurulması gereken önemli bir husustur (Gimenez-Bastida vd., 2015).

2.3. Gluten ve Çölyak Hastalığı

Gluten, tahıllardaki depo proteinleridir. Etanolde çözünebilen prolaminler ve polimerik gluteninler olmak üzere başlıca iki gruba ayrılmaktadır. Prolaminler buğdayda gliadinler olarak adlandırılmaktadırlar. Buğday depo proteinlerinin %80–85'ini oluşturmaktadır. Endospermde bulunan gluten proteinleri nişasta granüllerinin etrafında sürekli bir matriks oluşturmaktadır (Türksoy ve Özkaya, 2006).

Gluten proteinleri su veya tuzlu suda çözünmez özelliktedir. Monomerik gliadinler ve polimerik gluteninler olmak üzere iki fraksiyondan oluşmaktadır. Gliadinler; α , β , γ ve ω olarak alt fraksiyonlara da ayrılmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda gliadin fraksiyonunun çölyak hastaları için toksik, glutenin fraksiyonunun ise daha az toksik olduğu belirlenmiştir. Gliadinlerden de α -gliadinler en toksik olanıdır. β - ve γ - gliadinler biraz daha düşük toksisiteye sahip iken, ω -gliadinler en düşük toksisiteye sahip gliadin fraksiyonudur (Türksoy ve Özkaya, 2006).

Geçtiğimiz on yılda yapılan araştırmalar, LAB ekzopolisakkaritlerinin, ekşi hamur teknolojisiyle birlikte gluten içeren (başlıca buğday) ürünlerin kalitesini, özellikle de somun hacmine, raf ömrüne ve bayatlama oranına göre arttırma potansiyelini göstermiştir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritler tipik olarak yüksek moleküler ağırlıklı polimerlerdir. Ekzopolisakkaritler, hem gluten içeren hem de glutensiz tahıl ürünlerinin geliştirilmesi için ticari hidrokolloidlere doğal bir alternatif sunar (Lynch vd., 2018).

LAB'ların proteolitik aktivitesi, çölyak hastalığında etkili olan gluten kaynaklı belirli allerjen bileşenleri azaltmak için bir araç olabilir (Rollan vd., 2005).

Çölyak hastalığı (ÇH) ya da gluten enteropatisi insanlarda çok sık görülen ve ömür boyu süren besin kökenli otoimmün bir ince barsak hastalığıdır. ÇH, glutenin diyet yolu ile alınmasıyla tetiklenen ve CD4⁺ T hücrelerinin aracılık ettiği, gıdaya duyarlı çok yaygın bir enteropatidir (D'Arienzo vd., 2011). Çölyak hastalığı, genetik olarak çevresel ve genetik faktörlerin (MHC genleri) etkileşimi ile ortaya çıkan multifaktöriyel bir hastalıktır. Genetik aktarımı, hastalık olarak değil hastalığa yatkınlık olarak geçer. Buğday, arpa, çavdar ve yulaf gibi tahılların içeriğinde gluten vardır (Güre, 2009).

Diyette tüketilen gıda ince bağırsakta bileşenlerine ayrıştırılarak bağırsak mukozası üzerinden kana geçer. Yeterince alınması gereken gıdalar bağırsaklarda villus adı verilen çıkıntılar (Şekil 2.3.) sayesinde olmaktadır.

Gluten hassasiyeti olan kişilerde gluten içeren gıdalar tüketilmeye başlandığında ince bağırsaklarda mukozasında bulunan gliadin peptidleri ile “İnsan Lökosit Antijenleri (HLA)” sınıf II molekülleri birleşerek alerjik reaksiyona sebep olur ve zamanla villus denen çıkıntılar küçülür ve azalmaktadır. Bu alerjik reaksiyonu en fazla gösteren HLA-DQ2 ve DQ8 doku gruplarıdır. Bu durum bir süre sonra beslenme yetersizliğe sebep olur ve böylece ÇH hastalığı ortaya çıkmaktadır. ÇH'nin klinik belirtileri Çizelge 2.2'de sunulmuştur (Demirçeken, 2011).

Çizelge 2.2 ÇH'nin klinik belirtileri (Demirçeken, 2011)

Gastrointestinal:		
Erken başlangıç	Geç başlangıç	
<ul style="list-style-type: none"> • 2 yaş altı • Kronik ishal/yağlı dışkı • İştahsızlık • Kilo alamama • Karın şişliği (abdominal distansiyon) • Kas erimesi, cilt altı yağ dokusunun kaybolması, • Apati (donukluk)/huzursuzluk • Hipotoni 	<ul style="list-style-type: none"> • Çocukluktan erişkin döneme kadar her yaş • İshal veya cıvık dışkı (değişken/aralıklı) • Bulantı/kusma • Karında rahatsızlık hissi/şişkinlik (dispepsi) • Tekrarlayan karın ağrısı • Kilo kaybı • Kabızlık 	
Gastrointestinal sistem dışı:		
Kas-iskelet sistemi belirtileri	Mukoza-deri belirtileri	Hematolojik belirtiler
<ul style="list-style-type: none"> • Kısa boy • Rikets • Osteoporoz • Diş mine tabakası bozuklukları • Artrit ve artralji • Myopati 	<ul style="list-style-type: none"> • Dermatisis herpetiformis • Tekrarlayan aftöz stomatit • Vaskulit 	<ul style="list-style-type: none"> • Anemi (demri/folat/B₁₂ eksikliği) • Lökopeni • Trombositopeni • Vitamin E veya vitamin K eksikliği

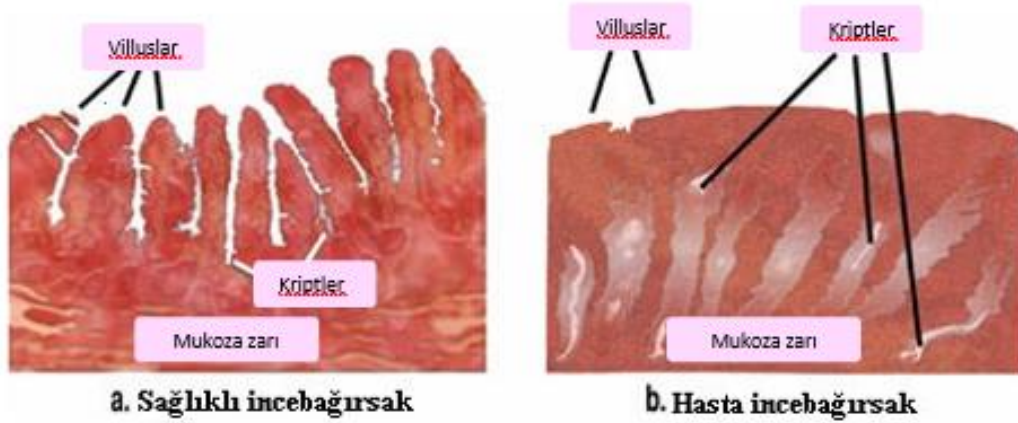
Çizelge 2.2 ÇH'nin klinik belirtileri (devam) (Demirçeken, 2011)

Gastrointestinal sistem dışı:		
Üreme sistemi belirtileri	Nöro-psikiyatrik belirtiler	Diğer belirtiler
<ul style="list-style-type: none"> • Gecikmiş ergenlik • Adet düzensizlikleri/amenore • Tekrarlayan düşüklerve/veya infertilite 	<ul style="list-style-type: none"> • Serebral kalsifikasyonla birlikte olan epilepsi • Serebellar ataksi • Periferel nöropati • Anksiyete, depresyon, demans, şizofreni, dikkat eksikliği, algı bozuklukları • Baş ağrısı 	<ul style="list-style-type: none"> • Karaciğer enzim yüksekliği ve kronik hepatit • Açıklanamayan kilo kaybı • Yorgunluk, zayıflık • Saç dökülmesi • İntestinal lenfoma

ÇH'nin klinik belirtileri doğrultusunda teşhisi doğru koyabilmek amacıyla ilk yapılacak testler; IgG ve IgA tipi anti gliadin antikor, IgA tipi anti endomisium antikor ve transglutaminaz antikor testleridir. Bu test sonuçlarında en az bir tanesinin pozitif sonuç vermesi ile ÇH olma şüphesi ortaya çıkmaktadır. Bir sonraki izlenecek yol ince bağırsak biyopsisidir. Kesin teşhis için yapılan bütün testler ile biyopsi sonucunun birbirini desteklenmesi gerekmektedir (Ün ve Aydogdu, 2003; Ulusoy vd., 2002).

ÇH için medikal bir tedavi söz konusu değildir. Tek tedavi yöntemi ömür boyu glutensiz diyet ile beslenmektir. Medikal tedavi ancak destek amaçlı olabilmektedir. ÇH'ye sahip bireylerde anemi belirtileri gösterenlere demir takviyesi, D vitamini desteği ya da sekonder laktoz intoleransı oluşan hasta bireylerin süt ve süt ürünlerinde bir süre uzak durulması şeklindedir (Güre, 2009).

Glutensiz bir diyetle tüketilmemesi gereken gıdaların başında buğday, çavdar, kılçıksız buğday, yulaf ve kamut unları, bileşenleri ve yan ürünlerinden yapılan gıdalar gelmektedir. Sosisli sandviç, salata sosları, hazır konserve çorbalar, kuru çorbalar, işlenmiş peynirler, krema gibi kalınlaştırıcı ve dolgu maddeleri ve hap ya da tablet gibi gıda tavsiyesi olarak kullanılan gluten ve benzeri proteinleri içeren ilaçlar bulunmaktadır (Güre, 2009; Gobbetti vd., 2007).



Şekil 2.3 a:Sağlıklı bir bireyin ince bağırsak epitel dokusu ve villuslar, b: çölyak hastası bir bireyin ince bağırsak epitel dokusu ve villuslar (Erdil ve Ateş, 2005).

1976'da Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün Glutensiz ürünler için Kodeks Standartları, Kodeks Gıda Komisyonu (Codex Alimentarius Commision) ve Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agricultural Organization-FAO) tarafından kabul edilmiştir (Güre, 2009). Türk Gıda Kodeksi Gluten İntoleransı Olan Bireylere Uygun Gıdalar Tebliği'nde , son tüketiciye sunulacak olan gıdalardaki gluten seviyesinin 20 mg/kg'yi aşmaması koşulu ile “glutensiz” ibaresinin kullanılabileceğini belirtmiştir.

Probiyotikler, ÇH'nin diyet tedavisinde ilginç bir yardımcı madde olarak görülmektedir. Yapılan birçok çalışma spesifik probiyotiklerin, glutenin polipeptitlerini sindirdiğini veya değiştirdiğini bulmuştur. Bunun yanısıra, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerine ait bazı bakteri türlerinin , gliadinin neden olduğu hasarın epitel hücreleri üzerinde koruyucu özellikler gösterdiğini de belirtmiştir (de Sousa Moraes, 2014).

Lactobacilli ve *Bifidobacteria*, insan sağlığı üzerinde faydalı etkileri olan ve probiyotik ürün formülasyonlarında yaygın olarak kullanılan temel bağırsak mikrobiyotik cinsleri olarak kabul edilmişlerdir (Cristofori, 2020).

Gluteni hidrolize edebilen bakteriler içeren probiyotikler ile tedavi, ÇH'nin tamamlayıcı tedavisi için olası yeni bir strateji olarak görülmeye başlanmıştır. Çalışmalarda, bağırsaktaki temel gluten metabolize eden bakteri olarak tanımlanan farklı laktobasil türleri sunulmuştur (Cristofori, 2020).

2.4. Gluten ve gliadin degradasyonu yapan LAB'lar

Sağlıklı bağırsak mikrobiyotası, insanlar tarafından üretilmeyen enzimler aracılığıyla gluten ve glutenin toksik fraksiyonu olan gliadin peptitlerinin parçalanmasında rol oynayabilen birkaç bakteri türü ile karakterize edilen çok karmaşık bir ekosistemdir (Cristofori, 2020).

Gluteni hidrolize etmek için ÇH'de tamamlayıcı bir tedavi olarak probiyotiklerin olası kullanımına bakılan bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, bazı *Bifidobacterium* türlerinin toksik gliadin türevi olan peptitleri hidrolize etme ve ayrıca bağırsak epitel hücrelerindeki inflamatuvar tepkiyi baskılama kabiliyetine sahip olduğunu göstermiştir (Cristofori, 2020).

Yapılan çalışmada buğday gliadinleri ile ilgili farklı hidroliz profilleri için belirlenen bir *Lactobacillus alimentarius* 15M, *Lactobacillus brevis* 14G, *Lactobacillus sanfranciscensis* 7A ve *Lactobacillus hilgardii* 51B'den oluşan birleşimin, alfa-gliadin ve 33-mer peptidin 62-75 fragmanını tamamen hidrolize ettiği belirtilmiştir (Di Cagno vd., 2004).

Bir başka çalışmada bir probiyotik bileşiminin (*Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*, *Bifidobacterium breve* Bbr8, *Bifidobacterium breve* BL10) gliadinin sindirimini yanında gluten peptitlerini de hidrolize etme ve pro-inflamatuvar tepkiyi iyi olarak modifiye edebilme yeteneği incelenmiştir. Bağırsakta gliadinden kaynaklı olan epitel modifikasyonu test edilen probiyotik bileşimin, sindirim proteazları tarafından üretilen gliadin fragmanlarını daha küçük parçalara hidrolize ettiğini belirtmişlerdir. Özellikle, moleküler ağırlığı 3 kDa'dan düşük olan peptitlerin sayısının önemli ölçüde yüksek olduğunu sunmuşlardır (Giorgi vd., 2020).

ÇH'nin bağırsak mikrobiyotasından izole edilen *Bacteroides fragilis* suşları, gliadin hidrolize edebilme aktivitesi sergilerken, bazıları immünojenik peptidlere yol açarak bağırsak epitel hücreleri tarafından inflamatuvar sitokin üretimini indüklediğini ortaya koymuştur (Sanchez vd., 2012).

Başka bir çalışma ÇH'nin duodenumundan geri izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının, elastaz aktivitesi yolu ile hastalarda gluten spesifik T hücrelerinin aktivasyonunu ortaya çıkaran birkaç peptit üretilmiştir (Caminero vd., 2016).

Yapılan farklı bir çalışmada domuzların proksimal sindirim sisteminden immünojenik gluten peptitlerini parçalayabilen bakteriler izole edilerek, tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. İzolatlar, özel proteolitik enzimlerin üretimi ve çölyak hastalığının nedenindeki yerleşik rollere sahip olan a-gliadin (16-mer ve 33-mer) ve x-gliadin'den (17-mer) ölçülebilen peptitleri indirgeme ve uzaklaştırma yetenekleri açısından taranmıştır. Sonuçların bu çalışmada, çölyak hastalığı olan hastaların ince bağırsak epiteline ulaşmadan önce epitop içeren gluten peptitlerindeki azaltmayı amaçlayan probiyotik uygulamalar için *Lactobacillus* suşlarının seçilmesine temel oluşturduğunu belirtmiştir (Duar vd., 2015).

Uzun süreli fermantasyon sırasında hidrolize buğday glutenine belirlenen enterokok ve fungal proteazlardan oluşan bir birleşimin kullanılması amaçlanmıştır. Enterokok ve fungal proteazların beraber kullanımı, uzun süreli fermantasyonda gluten konsantrasyonunda %98'den fazla bir azalmanın görüldüğü belirtilmiştir. Seçilen Enterokoklar ve *R. oryzae* proteazlarının birleşimin kullanılmasının, gıdalardaki gluten konsantrasyonunu azaltmak adına potansiyel bir araç olarak düşünülebilir denmiştir (M'hir vd., 2008).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Ekşi maya, hamur ve un örnekleri

LAB'ların izole edildiği örnekler ve temin edildikleri yerler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 İzolasyon için kullanılan örnekler ve temin edildikleri yerler

Örnek	Temin edildiği yer
Ticari maya (Dr. Qetker)	Yerel market
Ekşi maya	Fethiye/Muğla
Siyez unu	Fethiye/Muğla
Kızıltan unu	Fethiye/Muğla
Ekşi maya (Kızıltan unu)	Gıda Lab./ESOGÜ
Ekşi maya (Siyez unu)	Gıda Lab./ESOGÜ
Hamur	Topçuoğlu fırını/Eskişehir

3.1.2. Gluten

Gluten hidrolizi çalışmalarında buğday gluteni kullanılmıştır (Naturalys W). Buğday gluteni görünümü krem renkte ve toz halindedir. Çözünürlüğü yaklaşık %65'tir.

3.1.3. Gliadin

Çalışmalarımızda buğdaydan elde edilen gliadin (G3375-Sigma) kullanılmıştır.

3.1.4. Antimikrobiyal aktivite çalışmasında indikatör olarak kullanılan mikroorganizmalar

Çalışmada LAB suşlarının antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için kullanılan test mikroorganizmalarının isimleri, katalog numaraları ve temin edildikleri yerler Çizelge 3.2’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2 Test mikroorganizmaları

Bakteriler	Katalog numaraları
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC 35150
<i>Bacillus cereus</i>	LMG 8221
<i>Serratia marcescens</i>	NRRL B-2544
<i>Micrococcus luteus</i>	NRRL B-1018
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LMG 6395
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Staphylococcus warneri</i>	Eskişehir Teknik Üniversitesi
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Eskişehir Teknik Üniversitesi
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111
<i>Salmonella typhimurium</i>	NRRL B-4420
Mayalar	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 60193
<i>Candida tropicalis</i>	NRRL Y-12968
<i>Candida glabrata</i>	NRRL Y-1418
<i>Candida krusei</i>	ATCC 90028

ATCC : American Type Culture Collection, LGC Standards GmbH Mercatorstr. 51 46485 Wesel Germany.

BCCM/LMG: Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms. Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent, Belgium.

NRRL: United States Department of Agriculture Agricultural Research Service, Peoria, Illinois, USA.

3.1.5.G. *G. mellonella* (Bal güvesi) larvası

Çalışmada kullanılan *G. mellonella* larvaları Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyolojisi laboratuvarından temin edilmiş ve üretimleri laboratuvarımızda yapılmıştır.

G. mellonella laboratuvar ortamında yetiştirilebilen, kültürü yapılabilen, ekonomik, hızlı büyüyen ve yaşam döngülerinin kısa olması sebebiyle çalışmalarda çabuk sonuç alınabilen ve kısa sürede çok fazla yumurta bırakarak çok sayıda sağlıklı bireyler yetişen bir türdür (Köse, 2019; Akyol, 2013).

Ergin bireyleri gececil (nokturnal) böceklerdendir. Geceleri aktif, gündüzleri karanlıktadırlar. Dişi ve erkek bireyleri her çiftleşme sonrası yaklaşık 50-150 yumurta bırakır. Dişi erginler yaşam döngüleri boyunca yaklaşık olarak 600-700 yumurta bırakabilirler (Akyol, 2013). Yumurtalarını arıların ulaşamayacağı bölgeler olan peteklerin çatlak bölgelerine bırakmayı tercih ederler. Beyaz-krem renkteki yumurtaların uzunluğu ortalama 0,45 mm ve yaklaşık 0,40 mm'lik çapındadır. Bu nedenle çıplak gözle görmek zordur (Charriere ve Imdorf, 1997).

Optimum ortam koşulu sıcaklık 29-35°C, bağıl nem %29-33 olacak şekilde ayarlandığı zaman yumurtaların çatlaması ve larvaların çıkması 8 ila 15 arasında değişmektedir. Larvaların sağlıklı bireyler olması ve gelişimi besin, sıcaklık ve nem oranı gibi çevresel faktörlere bağlıdır. Yaklaşık olarak ortalama 28 mm'ye kadar gelişim gösterirler ve 40 gün içinde larval gelişimlerini tamamlayarak pupa dönemine geçiş yaparlar. Besin kaynakları petek, polen, bal ve mum gibi besinler olduğu için arıcılıkta ekonomik zarara neden olurlar (Çağlar ve Tutkun, 2001).

Ortalama 40 gün içinde larva dönemini tamamlayan larvaların her biri kendine koza örerek pupa evresine geçiş yapmaktadır. Bu pupa evresinde herhangi bir besine ihtiyaç duymamaktadırlar. Pupalar görünüş olarak sarı-turuncu arasında bir renge sahiptirler. Pupa evresi sıcaklık ve neme bağlı olarak değişmekte olup 7 ila 15 gün kadar sürmektedir. Pupa evresi tamamlayarak kelebek haline dönüşen ergin bireyler 24 saat içinde çiftleşmektedir. Dişi bireyler görünüş olarak erkek bireylere göre daha iri ve büyüktür (Charriere ve Imdorf, 1997).

3.1.6. Çalışmada kullanılan besiyerleri

Çalışmada kullanılan tüm besiyerleri; besiyeri içeriğinin distile suda homojen hale gelene kadar çözünüp istenen pH'a ayarlandıktan sonra otoklavda 1.2 atm basınç altında gereken sıcaklık ve süre boyunca steril edilmesiyle hazırlanmıştır.

3.1.6.1. MRS Agar (Lactobacillus Agar acc. to De Man, Rogosa and Sharpe)

Kazein peptonu	10	g
Et ekstraktı	10	g
Maya ekstraktı	4	g
D(+) glukoz	20	g
K ₂ HPO ₄	2	g
Tween 80	1	g
Di- Amonyum hidrojen sitrat	2	g
Sodyum asetat	5	g
MgSO ₄	0,2	g
MnSO ₄	0,04	g
Agar	14	g
Distile su	1000	ml

Dehidre besiyeri içeriği litrede 68,2 gram (g) olacak şekilde distile su içinde eritildikten sonra ısıtılarak homojen hale getirilmiştir. pH'ı $5,5 \pm 0,2$ şeklinde ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika (dk) steril edilmiştir.

3.1.6.2. MRS Broth (Lactobacillus Broth acc. to De Man Rogosa and Sharpe)

Kazein peptonu	10	g
Et ekstraktı	8	g
Maya ekstraktı	4	g
D(+) glukoz	20	g
K ₂ HPO ₄	2	g
Tween 80	1	g
Di- Amonyum hidrojen sitrat	2	g

Sodyum asetat	5	g
MgSO ₄	0,2	g
MnSO ₄	0,04	g
Distile su	1000	ml

Dehidre besiyeri içeriği litrede 52,2 g olacak şekilde distile su içinde eritildikten sonra ısıtılarak homojen hale getirilmiştir. pH'ı $5,7 \pm 0,2$ şeklinde ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilmiştir.

3.1.6.3. Nutrient Agar (NA)

Et peptonu	5	g
Et ekstraktı	3	g
Agar	12	g
Distile su	1000	ml

Dehidre besiyeri içeriği litrede 20 g olacak şekilde distile su içinde eritildikten sonra ısıtılarak homojen hale getirilmiştir. pH'ı $7 \pm 0,2$ şeklinde ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilmiştir.

3.1.6.4. Nutrient Broth (NB)

Et peptonu	5	g
Et ekstraktı	3	g
Distile su	1000	ml

Dehidre besiyeri içeriği litrede 8 g olacak şekilde distile su içinde eritildikten sonra ısıtılarak homojen hale getirilmiştir. pH'ı $7 \pm 0,2$ şeklinde ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilmiştir.

3.1.6.5. M17 Agar (acc. to Terzaghi)

Soya peptonu	5	g
Et peptonu	2,5	g
Kazein peptonu	2,5	g
Maya ekstraktı	2,5	g
Et ekstraktı	5	g
D(+) laktoz	5	g
Askorbik asit	0,5	g
Na-B- gliserofosfat	19	g
MgSO ₄	0,25	g
Agar	12,75	g
Distile su	1000	ml

Dehidre besiyeri içeriği litrede 55 g olacak şekilde distile su içinde eritildikten sonra ısıtılarak homojen hale getirilmiştir. pH'ı $7 \pm 0,2$ şeklinde ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilmiştir.

3.1.6.6. Gluten Agar-1 (GA-1)

Buğday gluteni	10	g
Tripton	5,6	g
Maya ekstraktı	2,5	g
D(+) glukoz	1	g
CaCl ₂	2	g
Sitrik asit monohidrat	4	g
Na ₂ HPO ₄	22,96	g
Agar	15	g
Distile su	1000	ml

Dehidre besiyeri içeriği litrede 63,06 g olacak şekilde distile su içinde eritildikten sonra ısıtılmıştır. Buğday gluteni suda çözünmediği için homojen bir görünüm olmamıştır. pH'ı $7 \pm 0,2$ şeklinde ayarlanmıştır. Otoklavda 105°C'de 10 dk steril edilmiştir (Wehrle vd., 1999).

3.1.6.7. Gluten Broth-1(GB-1)

Buğday gluteni	10	g
Tripton	5,6	g
Maya ekstraktı	2,5	g
D(+) glukoz	1	g
CaCl ₂	2	g
Sitrik asit monohidrat	4	g
Na ₂ HPO ₄	22,96	g
Distile su	1000	ml

Dehidre besiyeri içeriği litrede 48,06 g olacak şekilde distile su içinde eritildikten sonra ısıtılmıştır. Buğday gluteni suda çözünmediği için homojen bir görünüm olmamıştır. pH'ı $7 \pm 0,2$ şeklinde ayarlanmıştır. Otoklavda 105°C'de 10 dk steril edilmiştir.

3.1.6.8. Gluten Broth -2 (GB-2)

Buğday gluteni	90	g
D(+) glukoz	20	g
KH ₂ PO ₄	10	g
K ₂ HPO ₄	10	g
Na ₂ HPO ₄	22,96	g
Tween 80	1	g
Distile su	1000	ml

Dehidre besiyeri içeriği litrede 153,96 g olacak şekilde distile su içinde eritildikten sonra ısıtılmıştır. Buğday gluteni suda çözünmediği için homojen bir görünüm olmamıştır. pH'ı $6 \pm 0,2$ şeklinde ayarlanmıştır. Otoklavda 116°C'de 10 dk steril edilmiştir (Gerez vd., 2006; Stefanska vd., 2016).

3.1.6.9. Gluten Agar-2 (GA-2)

Buğday gluteni	90	g
D(+) glukoz	20	g

KH ₂ PO ₄	10	g
K ₂ HPO ₄	10	g
Na ₂ HPO ₄	22,96	g
Tween 80	1	g
Agar	15	g
Distile su	1000	ml

Dehidre besiyeri içeriği litrede 168,96 g olacak şekilde distile su içinde eritildikten sonra ısıtılmıştır. Buğday gluteni suda çözünmediği için homojen bir görünüm olmamıştır. pH'ı $6 \pm 0,2$ şeklinde ayarlanmıştır. Otoklavda 116°C'de 10 dk steril edilmiştir.

3.1.6.10. Gliadin Glukoz Broth (GGB)

Glukoz	20	g
Gliadin	2	g
K ₂ HPO ₄	2	g
Na-asetat .3H ₂ O	5	g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2	g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,05	g
Tween 80	1	ml
Distile su	1000	ml

Dehidre besiyeri içeriği litrede 29,25 g olacak şekilde distile su içinde eritildikten sonra ısıtılmıştır. Gliadin suda çözünmediği için homojen bir görünüm olmamıştır. pH'ı 6,2-6,6 şeklinde ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 20 dk steril edilmiştir (M'hir vd., 2008).

3.1.6.11. Gliadin Glukoz Agar (GGA)

Glukoz	20	g
Gliadin	2	g
K ₂ HPO ₄	2	g
Na-asetat .3H ₂ O	5	g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2	g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,05	g

Tween 80	1	ml
Agar	15	g
Distile su	1000	ml

Dehidre besiyeri içeriği litrede 44,25 g olacak şekilde distile su içinde eritildikten sonra ısıtılmıştır. Gliadin suda çözünmediği için homojen bir görünüm olmamıştır. pH'ı 6,2-6,6 şeklinde ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 20 dk steril edilmiştir.

3.1.6.12. Mueller-Hinton Agar (MHA)

Et ekstraktı	2	g
Kazein hidrozilatı	17,5	g
Nişasta	1,5	g
Agar	13	g
Distile su	1000	ml

Dehidre besiyeri içeriği litrede 34 g olacak şekilde distile su içinde eritildikten sonra ısıtılmıştır. pH'ı $7,4 \pm 0,2$ şeklinde ayarlanmıştır. Otoklavda 115°C'de 10 dk steril edilmiştir.

3.1.6.13. Mueller-Hinton Broth (MHB)

Et ekstraktı	2	g
Kazein hidrozilatı	17,5	g
Nişasta	1,5	g
Distile su	1000	ml

Dehidre besiyeri içeriği litrede 21 g olacak şekilde distile su içinde eritildikten sonra ısıtılmıştır. pH'ı $7,4 \pm 0,2$ şeklinde ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilmiştir.

3.1.6.14. Malt Ekstrakt Agar (MEA)

Dehidre besiyeri içeriği litrede 48 g olacak şekilde distile su içinde eritildikten sonra ısıtılmıştır. pH'ı $5,4 \pm 0,2$ şeklinde ayarlanmıştır. Otoklavda 115°C'de 10 dk steril edilmiştir.

3.1.6.15. Malt Ekstrakt Broth (MEB)

Dehidre besiyeri içeriği litrede 20 g olacak şekilde distile su içinde eritildikten sonra ısıtılmıştır. pH'ı $5,4 \pm 0,2$ şeklinde ayarlanmıştır. Otoklavda 115°C 'de 10 dk steril edilmiştir.

3.1.6.16. Kazein Agar

Skim milk	50	g
D(+) glukoz	1	g
Kazein	5	g
Maya ekstraktı	2,5	g
Agar	12,5	g
Distile su	1000	ml

Dehidre besiyeri içeriği litrede 71 g olacak şekilde distile su içinde eritildikten sonra ısıtılmıştır. pH'ı $6,8 \pm 0,2$ şeklinde ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C 'de 15 dk steril edilmiştir (Rahmati, 2017; IFU, 2020).

3.1.6.17. Jelatin Agar

Pepton	4	g
Maya ekstraktı	1	g
Jelatin	15	g
Agar	15	g
Distile su	1000	ml

Dehidre besiyeri içeriği litrede 35 g olacak şekilde distile su içinde eritildikten sonra ısıtılmıştır. pH'ı $7,2 \pm 0,2$ şeklinde ayarlanmıştır. Altı düz ağzı vidalı kapaklı cam tüplere 5 ml dağıtılmıştır. Otoklavda 121°C 'de 15 dk steril edilmiştir. Otoklav sonrası tüpler $+4^{\circ}\text{C}$ 'de dik olarak muhafaza edilmiştir (FDA, 2020).

3.1.6.18. Sporulasyon besiyeri

Nutrient agar	20	g
MnSO ₄	0,04	g
CaCl ₂	0,10	g
Distile su	1000	ml

Dehidre besiyeri litresinde 20,14 g olacak şekilde hazırlanmıştır ve otoklavda 121 °C’de 15 dk steril edilmiştir (Elçioğlu, 2010).

3.1.6.19. Skim milk agar

Skim milk	10	g
Agar	2	g
Distile su	100	ml

Dehidre besiyeri 100 ml de 12 g olacak şekilde distile su içinde eritildikten sonra pH’ı $7,2 \pm 0,2$ şeklinde ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C’de 15 dk steril edilmiştir (Elçioğlu, 2010).

3.1.6.20. Safra tuzuna direnç çalışması için çift kuvvetli MRS Broth ortamı

İçeriği 3.1.5.2’de verilmiş olan MRS broth besiyerini çift kuvvetli olarak hazırlamak için hacim başına iki katı madde tartılmıştır ve distile su içinde eritildikten sonra ısıtılarak hazırlanmıştır. pH’ı $5,7 \pm 0,2$ şeklinde ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C’de 15 dk steril edilmiştir.

3.1.6.21. MRS Broth (pH1, pH2, pH3 ve pH4)

İçeriği 3.1.5.2’de verilmiş olan MRS broth besiyeri istenilen hacime karşılık gelen madde miktarı tartılarak distile su içinde eritildikten sonra ısıtılarak hazırlanmıştır. Hazırlanmış olan besiyeri soğuduktan sonra pH’ı 1, 2, 3 ve 4 olacak şekilde derişik HCl ile ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C’de 15 dk steril edilmiştir.

3.1.6.22. %0,3 Safra tuzu (Ox bile) içeren çift kuvvetli MRS Broth ortamı

İçeriği 3.1.5.2’de verilmiş olan MRS broth besiyerini çift kuvvetli olarak hazırlanmıştır. İçerisine %0,3 g olacak şekilde safra tuzu (FLUKA) ilave edilmiştir. pH’ı $7,0 \pm 0,2$ şeklinde ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C ’de 15 dk steril edilmiştir (Abanoz, 2014).

3.1.6.23. %0,6 Safra tuzu (Ox-bile) içeren çift kuvvetli MRS Broth ortamı

İçeriği 3.1.5.2’de verilmiş olan MRS broth besiyerini çift kuvvetli olarak hazırlanmıştır. İçerisine %0,6 g olacak şekilde safra tuzu ilave edilmiştir. pH’ı $7,0 \pm 0,2$ şeklinde ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C ’de 15 dk steril edilmiştir edilmiştir (Abanoz, 2014).

3.1.6.24. *G. mellonella* larvası sentetik besini

Siyah petek	200	g
Buğday kepeği	860	g
Bal	160	g
Gliserol	300	ml
Distile su	150	ml

Malzemeler blenderdan geçirilerek bir araya getirilmiştir. Larvalara besin olarak kullanılmak üzere -20°C ’de saklanmıştır (Çakır, 2019).

3.1.7. Çalışmada kullanılan çözeltiler ve boyalar

3.1.7.1. Serum fizyolojik (SF)

Litreye 8,5-9 g NaCl ilave edilip distile su da eritilerek homojen hale getirilerek tüplere 4,5 ml olacak şekilde dağıtılmış ve otoklavda 121°C ’de 15 dk steril edilmiştir.

3.1.7.2. %20'lik gliserol çözeltisi

Stok yapılacak mikroorganizmanın büyümesi için kullanılan besiyeri hazırlandıktan sonra içerisine litrede 250 ml gliserol ilave edilmiştir. Otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilmiştir. Steril olan kriyo tüplere 800 µl dağıtılarak hazır hale getirilmiştir (Öksüz, 2017).

3.1.7.3. NaOH ve HCl çözeltisi

Hazırlanan besiyerlerinin pH ayarlamasını yapmak için derişik NaOH ve HCl çözeltileri kullanılmıştır.

3.1.7.4. %3'lük H₂O₂ çözeltisi

%30'luk H ₂ O ₂ (MERCK)	0,5	ml
Distile su	4,5	ml

3.1.7.5. Fosfat üre magnezyum sülfat (PUM) tamponu (pH: 7.1)

K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	22,2	g
KH ₂ PO ₄	7,26	g
Üre	1,80	g
MgSO ₄	0,20	g

Distile su ile 1L'ye tamamlanmıştır (Rokana vd., 2018).

3.1.7.6. Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) (pH: 7.2)

NaCl	8	g
KCl	0,2	g
Na ₂ HPO ₄	1,44	g
KH ₂ PO ₄	0,24	g

Distile su ile 1L'ye tamamlanmıştır (Bilginer ve Çetin, 2019).

3.1.7.7. 50 mM Tris-HCl (pH8.0)

6,055 g Tris tartılır, 900 ml destile su içerisinde eritilip homojen hale getirildikten sonra HCl ile pH ayarlanmıştır. Ardından 1 L'ye tamamlanmıştır. 121 °C'de 15 dk steril edilmiştir (Wehrle vd. 1999).

3.1.7.8. Protein boyama çözeltisi

5 g Coomassie brilliant blue R-250

500 ml metanol

92 ml asetik asit

Distile su ile 1 L' ye tamamlanmıştır (Wehrle vd. 1999).

3.1.7.9. Boya uzaklaştırma çözeltisi

250 ml metanol

50 ml asetik asit

Distile su ile 1 L' ye tamamlanmıştır (Wehrle vd. 1999).

3.1.7.10. Kristal viyole

0,5 g kristal violet 100 ml distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Koyu renkli cam bir şişe içinde muhafaza edilmiştir.

3.1.7.11. Lugol

2 g Potasyum iyodür (KI) 300 ml distile su içerisinde çözünerek hazırlanmıştır. Bu çözeltiye 1 g iyice ezilmiş iyot kristali eklenmiştir ve oda sıcaklığında tam bir çözünme sağlayıp homojen hale gelene kadar karıştırılmıştır. Koyu renkli cam bir şişe içinde muhafaza edilmiştir.

3.1.7.12. Safranin

0,5 g safranin 10 ml %96'lık etil alkol içerisinde çözülmüştür ve 100 ml saf suyla karıştırılmıştır. Koyu renkli cam bir şişe içinde muhafaza edilmiştir.

3.1.7.13. Malaşit yeşili

5 g malaşit yeşilinin 100 ml saf su içinde çözünmesi ile hazırlanmıştır.

3.1.7.14. Yapay mide sıvısı pH2

NaCl	5	g
Pepsin	3	g
Distile su	1000	ml

Dehidre besiyeri içeriği litrede 8 g olacak şekilde distile su içinde eritildikten sonra pH'ı 2 olacak şekilde derişik HCl ile ayarlanmıştır. Sonrasında filtreden geçirilerek steril edilmiştir (Vinderola ve Reinheimer, 2003).

3.1.7.15. Yapay mide sıvısı pH3

NaCl	5	g
Pepsin	3	g
Distile su	1000	ml

Dehidre besiyeri içeriği litrede 8 g olacak şekilde distile su içinde eritildikten sonra pH'ı 3 olacak şekilde derişik HCl ile ayarlanmıştır. Sonrasında filtreden geçirilerek steril edilmiştir (Vinderola ve Reinheimer, 2003).

3.1.8. Çalışmada kullanılan cihazlar

Çizelge 3.3 Tez çalışmasında kullanılan cihazlar

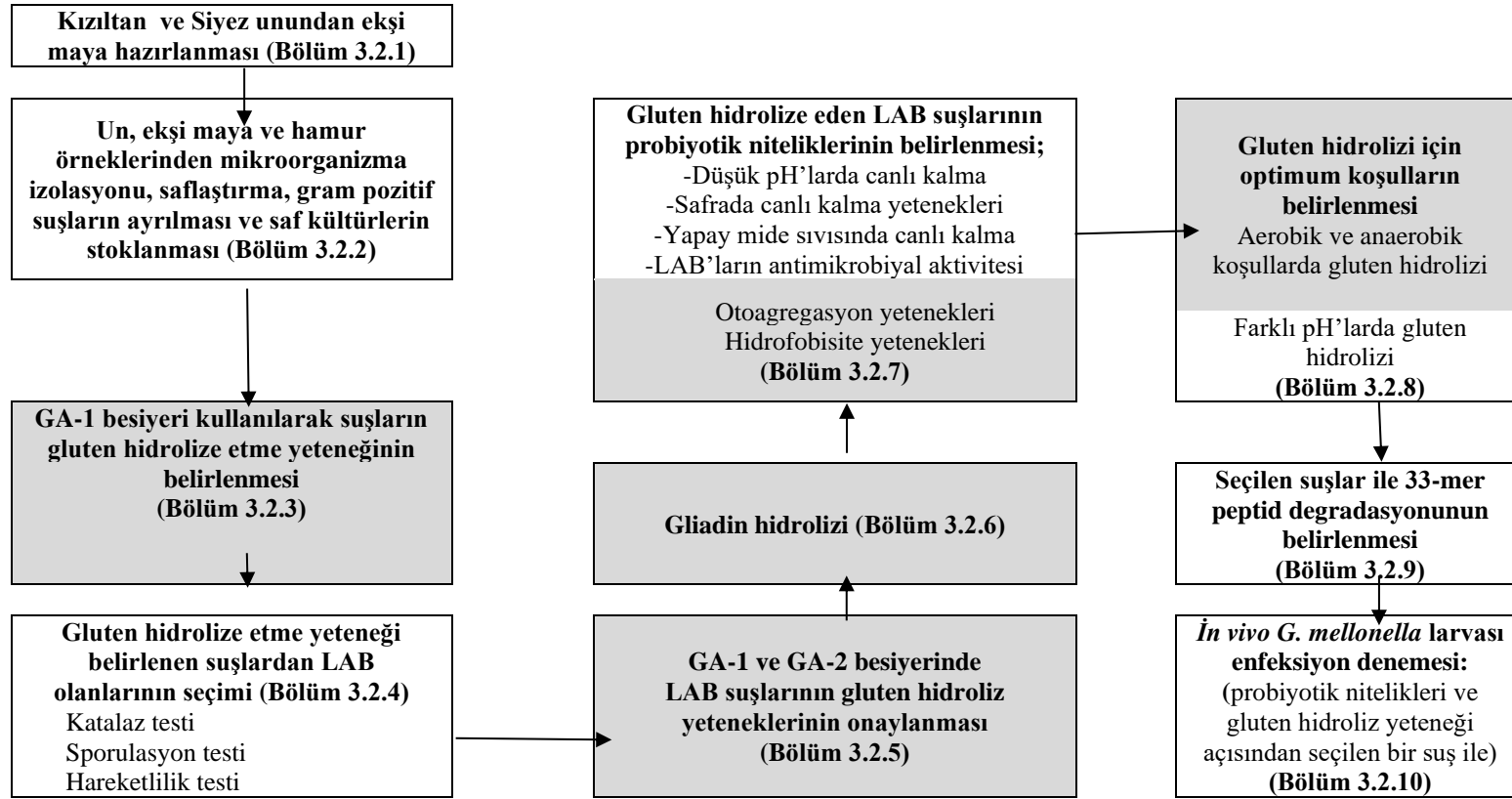
Cihaz Adı	Markası
İnkübatör	Binder
İnkübatör	J.P. Selecta
İnkübatör	M 6040 P (elektro.mag)

Çizelge 3.3 Tez çalışmasında kullanılan cihazlar (devam)

Cihaz Adı	Markası
Sterilizatör	Heraeus
Vortex	Velp Scientifica 2x3
Spektrofotometre	Shimadzu UV-2450 UV-VIS Spectrophotometer
pH Metre	WTW Series-İnoLab
Analitik Terazî	Ohaus
Hassas Terazî	Ohaus
Soğutmalı Santrifüj	Hermle
Çalkalamalı İnkübatör	Edmund Bühler GmbH
Çalkalamalı İnkübatör	Innova 44 Incubator Shaker Series
Steril Kabin	Esco
Steril kabin	Thermo
Isıtıcı ve Manyetik Karıştırıcı	Labart SH-5
Dikey Jel Elektroforez Sistemi	Bio-Rad
Derin dondurucu (-20 °C)	Arçelik ve Beko
Buzdolabı (+4 °C)	Arçelik ve Beko
Derin Dondurucu (-80 °C)	Haier Bio-Medical
Mikroskop	Olympus
Otoklav	Alp ve Sanyo Labo Autoclave
Mikro Pipetler	Eppendorf Research Pl
CO ₂ Jarı	Anaerocult
Blender	Waring Commercial
Ultrasonik Banyo	Bandelin Sonorex
Kumpas	Baytas

3.2. Yöntem

Çalışmadaki LAB izolasyonu, gluten hidrolize eden LAB'ların seçimi, seçilen suşların probiyotik niteliklerin belirlenmesi gibi aşamalar Şekil 3.1'de verilmiştir. Şekil 3.1'de verilen her bir aşamada yapılan çalışmalar devam eden bölümlerde detaylı olarak açıklanmıştır.



Şekil 3.1. Gluten hidrolize etme yeteneğine sahip suşların seçimi ve bunların probiyotik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmaların akışını gösteren şema. Bu tez çalışması kapsamında izole edilmiş un, ekşi maya ve ekmek hamuru kökenli suşlar ile yapılan çalışmalar beyaz kutular olarak verilmiştir. Daha önceki bir çalışmada, peynirden izole edilmiş LAB suşlarının da dahil edildiği çalışmalar gri renkli kutular olarak verilmiştir.

3.2.1. Kızıltan ve Siyez unundan ekşi maya yapımı

Laboratuvarda Kızıltan ve Siyez unundan iki farklı ekşi maya hazırlamak için aşağıdaki yol izlenmiştir;

1. gün cam kavanozun içine tahta kaşıkla 1 kaşık un, 1 kaşık su koyduktan sonra homojen hale gelene kadar karıştırılmıştır. Daha sonra cam kavanozun ağzı temiz bir bez ile kapatılmıştır. 24 saat oda sıcaklığında, doğrudan güneş almayan bir yerde bekletilmiştir.

2. gün yine aynı saatte 1 kaşık un 1 kaşık su eklenmiştir ve karıştırıp tekrar cam kavanozun ağzı temiz bir bez ile kapatılmıştır. 24 saat oda sıcaklığında, doğrudan güneş almayan bir yerde bekletilmiştir.

3. gün yine aynı saatte 2 kaşık un 2 kaşık su eklenmiştir ve karıştırıp tekrar cam kavanozun ağzı temiz bir bez ile kapatılmıştır. 24 saat oda sıcaklığında, doğrudan güneş almayan bir yerde bekletilmiştir.

4. gün yine aynı saatte cam kavanozdaki mayanın yarısını alıp geriye kalan mayanın üzerine 2 kaşık un 2 kaşık su eklenerek mayaya besleme işlemi yapılmıştır. Tekrar cam kavanozun ağzı temiz bir bez ile kapatılmıştır. 24 saat oda sıcaklığında, doğrudan güneş almayan bir yerde bekletilmiştir.

5. günde mayanın beslenmesi için 4. gündeki gibi bir işlem uygulanmıştır.

Mayanın kabarcıklı bir yapısı ve ekşi fakat hoş bir kokusu olmuştur. Böylece çalışmalara dahil edilmek üzere hazır hale getirilmiştir (Çifci, 2017).

3.2.2. Un, ekşi maya ve hamur örneklerinden mikroorganizma izolasyonu, saflaştırma ve saf kültürlerin stoklanması

Bu çalışma, daha sonraki çalışmalarda gluten hidrolize etme yetenekleri belirlenecek olan suşların izolasyonu ve saflaştırılması amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla öncelikle un, hamur ve ekşi maya örneklerinin dilüsyonları (Çizelge 3.4) hazırlanmıştır.

Örneklerden 10^{-1} dilüsyondan 10^{-7} dilüsyonuna kadar bir seri hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonlarda her örnek için 10^{-3} ile 10^{-6} aralığındaki dilüsyonlardan 100 µl alınarak drigalski spatülü ile MRS agar, MEA ve M17 agar besiyeri bulunan petrilere ekim yapılmıştır. Petriler 35°C 'de hem aerobik hem de anaerobik koşullarda (CO_2 jarları içerisine konularak) 48 saat (sa) inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda farklı şekil, renk ve büyüklüklerdeki koloniler seçilerek, her bir koloni izole edildiği besiyeri ile hazırlanmış yatık agar tüplerine inoküle edilmiştir. Tüpler 35°C 'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, her tüpten bir öze yardımı ile büyüme alınarak preparat hazırlanmış ve aşağıda verilen yöntemle gram boyamaları yapılmış, saflıkları ve morfolojileri belirlenmiştir. İnceleme sonucu saf olduğu belirlenen kültürler diğer testler uygulanmak üzere etiketlenmiş ve %20 gliserollü besiyeri bulunan kriyo tüplere 3 paralel olacak şekilde aktarılarak stok kültürleri hazırlanmış ve -20°C ile -80°C derin dondurucularda saklanmıştır.

Karışık olduğu belirlenen kültürler ise saflaştırmak amacıyla yeniden MRS agar, MEA ve M17 agar besiyerlerine tek koloni düşürmek amacı ile çizgi ekimleri yapılmıştır. Tek düşen koloniler yukarıda anlatılan şekilde saflıkları kontrol edilerek stok kültürleri hazırlanmıştır.

Çizelge 3.4 İzolasyon için kullanılan örneklerin hazırlanışı

Örnek	İzolasyon için örneklerin hazırlanışı
Ticari maya (Dr. Qetker)	1 g tartılarak 9 ml SF içerisinde süspanse edilmiştir.
Ekşi maya (Fethiye/Muğla)	
Siyez unu	
Kızıltan unu	
Ekşi maya (Kızıltan unu)*	
Ekşi maya (Siyez unu)*	
Topçuoğlu Ekmek Hamuru	25 g tartılarak 225 ml SF ile önceden 121°C 'de 15 dk steril edilmiş blenderda 1 dk homojenize edilmiştir.

*: Ekşi mayalar bölüm 3.2.1'de tarif edildiği gibi hazırlanmıştır.

Gram boyama: Kùltürlerin gram boyamasını yapmak için temiz bir lam üzerine bir damla su koyduktan sonra steril koşullar altında kùltürden bir öze dolusu örnek alınmıştır. Alınan örnek lam üzerindeki su ile karıştırılıp lamın üzerine yayılmıştır. Oda sıcaklığında bir süre bekletilerek kuruması sağlanmıştır. Kuruyan preparat ateşten 3 kere geçirilerek fikse edilmiştir. Gram boyaması için hazır hale getirilen preparata aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır:

1. Preparatın üzeri kristal viyole boyası ile kaplandıktan sonra 1 dk bekletilmiştir. 1 dk sonunda fazla boya dökülerek preparat distile su ile yıkanmıştır.
2. Yıkanan preparatın üzeri lugol çözeltisi ile kaplanmış ve 1 dk bekletildikten sonra dökülerek distile su ile yıkanmıştır.
3. Yıkanan preparat üzeri %96'lık etil alkol ile kaplandıktan sonra 10 saniye(sn) bekletilmiştir ve ardından hemen distile su ile yıkanmıştır.
4. Son adım olan safranin boyası ile preparat kaplandıktan sonra 30 sn bekletilmiştir. 30 sn sonunda fazla boya dökülmüştür ve preparat distile su yıkandıktan sonra oda sıcaklığında kurumak üzere bekletilmiştir (Beveridge, 2001).

Oda sıcaklığında kuruyan preparat mikroskopta x100 objektifte immersiyon yağı kullanılarak incelenmiştir. Mor renkte boyanan hücreler gram pozitif, pembe-kırmızı renkte boyanan hücreler gram negatif olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca hücre morfolojileri de kayıt edilmiştir. LAB'lar gram pozitif olduklarından, sadece gram pozitif olan suşlar gluten hidrolizi çalışmalarında ve diğer çalışmalarda kullanılmak üzere ayrılmıştır.

3.2.3. GA-1 besiyeri kullanılarak suşların gluten hidrolize etme yeteneğinin belirlenmesi

Bölüm 3.2.2'de ekşi mayalardan, Siyez unu ve Kızıltan unu örneklerinden elde edilen gram pozitif suşların ve ESOGÜ Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan (peynirden izole edilmiş) suşların gluten hidrolize etme yetenekleri GA-1 besiyeri kullanılarak belirlenmiştir. Bunun için gluten hidroliz yetenekleri belirlenecek olan tüm suşlar MRS brotha ekilmiş 35°C'de 24 saat inkübe edilmiştir.

Aktiflenen kültürlerden 10 µl alınarak, GA-1 besiyerlerinin yüzeyine damlatılmış ve 35 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Çalışma her bir suş için 3 paralel halinde yapılmıştır. İnkübasyon sonunda bütün petriyeler Coomassie Brilliant Blue R-250 protein boyası ile 5 dk boyanmıştır. Daha sonra petriyelerdeki fazla boya dökülmüş, boya uzaklaştırma çözeltisi eklenerek 24 saat bekletilmiş ve petriyelerdeki hidroliz zonlarının varlığı gözlenmiştir (Gerez vd., 2006; Stefańska vd., 2016). Koloni gelişimi gözlenen GA-1 besiyeri yüzeyinin boyanmaması gluten hidrolizini işaret etmiştir. Sonuç olarak, hidroliz yeteneği olan tüm suşlar daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere ayrılmıştır. Ekşi mayalardan, Siyez unu ve Kızıltan unu örneklerinden elde edilmiş ve gluten hidrolizi yeteneği belirlenmiş olanların LAB olup/olmadıkları belirlenmiştir.

3.2.4. Gluten hidrolize etme yeteneği belirlenen suşlardan LAB olanlarının seçimi

Ekşi mayalardan, Siyez unu ve Kızıltan unu örneklerinden elde edilmiş ve Bölüm 3.2.3 de GA-1 besiyerinde gluteni hidrolize ettikleri belirlenmiş suşlardan LAB olanların seçimini yapmak üzere aşağıdaki testler yapılmıştır. Ayrıca bu suşların aerobik ve anaerobik koşullarda büyümeleri karşılaştırılmıştır. İzolatlar MRS plaklarına çizgi ekimle ekilmiş, 35°C’de hem aerobik hem de anaerobik koşullarda (CO₂’li etüvde) 48 saat inkübe edilmiş ve koloni büyümeleri gözlenmiştir.

3.2.4.1. Katalaz testi

İzolasyonu yapılan suşların katalaz enziminin varlığı bu testle belirlenmiştir. Test için 24-48 saatlik sıvı ya da katı olarak hazırlanmış bakteri kültüründen bir öze dolusu alınmıştır ve temiz bir lama aktarılmıştır. Üzerine 1 damla %3’lük H₂O₂ damlatılmıştır. Kabarcık oluşumu gözlemlenen kültürler pozitif (+) olarak değerlendirilmiştir. Katalaz testi %30’luk H₂O₂ ile de aynı şekilde yapılmıştır (Reiner, 2010; Dinçer vd., 2019). LAB anaerobiktir, katalaz enzimi bulundurmazlar, bu nedenle sadece katalaz negatif olan suşlara diğer testler uygulanmıştır.

3.2.4.2. Spor oluşturma

Suşların spor oluşturup oluşturmadıklarını belirlemek için malaşit yeşili ile spor boyaması yapılmıştır. Sporulasyon besiyerine ekilen suşlar 5 gün 35°C’de inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda, petrielerde gelişen kolonilerden öze dolusu örnek alınarak üzerinde bir damla su olan lama yayılmıştır. Oda sıcaklığında kuruyan preparatlar üç kez ateşten geçirilerek fiksasyon işlemi yapılmıştır. Su banyosu düzeneği üzerinde preparatlar %5'lik malaşit yeşili boyası ile 5 dk boyanmıştır ve boyama sırasında preparatların üzerinin kurumaması için kurutma kağıdı kapatılmıştır ve kurutma kağıdı üzerinden boya ilavesine devam edilmiştir. 5 dk sonunda kağıtlar atılmıştır ve preparatlar saf su ile yıkanmıştır. Ardından preparatların 30 sn safranin ile boyaması yapılmıştır. 30 sn sonunda fazla boya dökülerek preparatlar yeniden saf su ile yıkanmıştır ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar ışık mikroskopunun x100 objektifi ile immersiyon yağı kullanılarak incelenmiştir. Sporangiumlar kırmızı, endosporlar ise yeşil olarak kayıt edilmiştir (Elçioğlu, 2010). LAB'lar spor oluşturmazlar, bu nedenle sadece spor oluşturmeyen suşlara sonraki testler uygulanmıştır.

3.2.4.3. Hareketlilik testi

Hareketlilik testi asılı damla yöntemi ile yapılmıştır. Bu yöntemde ortası çukur olan özel bir lam kullanılmıştır. Bu testte bakteriler MRS brothta aktiflenmiştir ve 18-24 saatlik kültürlerden bir öze dolusu alınıp lamelin ortasına konulmuştur. Lamelin dört köşesine kürdan yardımı ile vazelin sürülmüştür. Çukur lamın çukur kısmı damlanın tam ortasına gelecek şekilde lamelin üzerine yerleştirilmiş ve ters çevrilmiştir. Daha sonra ışık mikroskopunun ilk önce x4 objektifinde damla sınırı tespit edilmiştir. Damla sınırı tespit edildikten sonra x40 objektife geçilmiştir. Böylece damla içerisinde asılı kalan bakterilerin damla sınırındaki hareketleri rahatlıkla gözlemlenmiştir (Jain vd., 2020). LAB hareketsizdir, bu nedenle sadece hareketsiz olan suşlar LAB olarak değerlendirilmiştir.

3.2.5. GA-1 ve GA-2 besiyerlerinde LAB suşlarının gluten hidroliz yeteneklerinin onaylanması

Çalışmanın bu aşamasında, bölüm 3.2.4'de katalaz negatif, sporsuz ve hareketsiz olmaları nedeniyle muhtemel LAB olarak kabul edilen suşlar (un, ekşi maya ve hamur örneklerinden izole edilmiş) ve LAB oldukları önceden belirlenmiş suşların (peynir örneklerinden izole edilmiş) gluten hidrolize etme yetenekleri iki farklı gluten besiyerinde onaylanmıştır.

LAB olarak kabul edilen ve gluten hidrolize etme yetenekleri onaylanan toplam 43 suşun örneklere göre dağılımı aşağıdaki gibidir:

- 17 LAB ekşi maya örneklerinden izole edilmiştir,
- 20 LAB un örneklerinden izole edilmiştir,
- 2 LAB hamur örneklerinden izole edilmiştir,
- 4 LAB suşu peynir örneklerinden izole edilmiştir.

Gluten hidroliz etme yeteneklerini belirlemek için önce GB-1 ve GB-2 adını verdiğimiz iki farklı besiyeri kullanılmıştır. GB-2 besiyerinin GB-1 besiyerinden farkı, tek “azot kaynağı” olarak gluten içermesidir. GA-1 ve GA-2 besiyerleri ise, GB-1 ve GB-2 besiyerlerinin katı halidir.

LAB kültürleri MRS broth besiyerine ekilmiş ve 35°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Aktiflenen LAB kültürlerinin hücre yoğunlukları, Mc Farland 0,5 standartına göre ayarlanmıştır. Yoğunlukları ayarlanmış kültürlerin önceden hazırlanmış GB-1 besiyerine ekimleri yapılmıştır ve tekrar 35°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası bu kültürlerden 10 µl alınarak, içinde GA-1 besiyeri bulunan petrilere damla yöntemi ile ekim yapılmış ve petrilere 35°C’de 24 saat, aerobik ve anaerobik koşullarda inkübe edilmiştir. Çalışma her bir suş için 3 paralel olacak şekilde çalışılmıştır. İnkübasyon sonrası petrilere Coomassie Brilliant Blue R-250 protein boyası ile kaplanmış ve 5 dakika bu boya ile bekletilmiştir. Daha sonra petrilere fazla boya dökülmüş ve boya uzaklaştırma çözeltisi eklenerek 24 saat bekletilmiştir. 24 saat sonunda petrilere hidroliz zonlarının varlığı kontrol edilmiştir (Wehrle vd., 1999).

LAB’ların tek azot kaynağı olarak gluteni kullanabilme yetenekleri GB-2 ve GA-2 besiyeri ile belirlenmiştir. LAB suşları önce MRS broth besiyerine ekilerek 35°C’de 24 saatlik inkübe edilerek aktiflenmiştir. Aktiflenen LAB kültürlerinin hücre yoğunlukları Mc Farland 0,5 standartına göre ayarlanmıştır. Yoğunlukları ayarlanmış kültürlerin önceden hazırlanmış GB-2 besiyerine ekimleri yapılmıştır ve tekrar 35°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, yukarıda anlatılan şekilde, GA-2 besiyerine ekilerek, aerobik ve anaerobik koşullarda inkübe edilmiş ve hidroliz zonlarının varlığı kayıt edilmiştir (Gerez vd., 2006; Stefańska vd., 2016)

3.2.6. Gliadin hidrolizi

Bu aşamada bir önceki denemede gluten hidrolizi onaylanan LAB suşlarının, buğday gluteninin başlıca immünojenik bileşeni olan gliadini hidrolize etme yeteneği belirlenmiştir.

Gliadin testinde tüm gluten hidrolize edebilen suşlar değil, sadece seçilmiş suşlar kullanılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda iş yoğunluğunu azaltabilmek ve daha önemlisi, farklı türlere ait suşlarla çalışmayı garanti edebilmek amacıyla böyle bir seçim yapılmıştır. Bu seçim, öncelikle suşların izole edildikleri örneklerin türüne ve hidroliz zonlarının büyüklüklerine göre yapılmış, sonra da bakteri morfolojileri dikkate alınmıştır. Böylece 12 LAB suşu seçilmiştir. Seçilen 12 suş içerisinde siyez unundan elde edilen 4 suş vardır; 65 ve 68 no.lu suşlar basil, 107 ve 108 no.lu suşlar ise koko-basil morfolojidedir. Kızıltan unundan izole edilen 2 suş; 23 ve 24 no.lu suşlar kok formundadır. Ekşi mayadan (Muğla-Fethiye) izole edilen 2 suş; 16 ve 28 no.lu suşlar ise basil formundadır. Peynirden izole edilen suşlar ise; 11P, 16P, 38P ve 104P'dir.

Seçilen suşlar MRS broth besiyerine ekilmiş ve 35°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Aktiflenen LAB kültürlerinin Mc Farland 0,5 standartına göre hücre yoğunlukları ayarlanmıştır. Hücre yoğunluğu ayarlanan her bir kültür, gliadine adaptasyon amacıyla önce GGB besiyerine ekilmiş, 35°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Bu işlem iki kez yapılmıştır. GGB de ikinci aktifleme aşamasından sonra, önceden hazırlanmış GGA besiyeri yüzeyine damla ekim yöntemi ile 10 µl ekim yapılmıştır. Ekimi yapılan petriyerler 35°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Çalışma her bir suş için 3 paralel olacak şekilde çalışılmıştır. Pozitif kontrol suşu olarak *P. aeruginosa* negatif kontrol suşu olarak ise peynirden izole edilmiş ve gluten hidrolizi yapmadığı bilinen 10P kodlu suş çalışmaya dahil edilmiştir. İnkübasyon sonrası petriyerler hazırlanan Coomassie Brilliant Blue R-250 protein boyası ile 5 dk boyanmıştır. Daha sonra petriyerlerdeki fazla boya dökülmüştür ve petriyerlere boya uzaklaştırma çözeltisi eklenerek 24 saat bekletilmiştir. 24 saat sonunda petriyerlerdeki hidroliz zonlarının varlığı kontrol edilmiştir (M'hir vd., 2008).

3.2.7. Gluten hidrolize eden LAB suşlarının probiyotik niteliklerinin belirlenmesi

Probiyotik niteliklerin belirlenmesine yönelik tüm testler; un, ekşi maya ve ekmek hamuru kökenli olan ve gluten hidrolize eden 39 LAB suşu üzerinde uygulanmıştır.

Bu amaçla; düşük pH'da canlı kalma, safrada canlı kalma, yapay mide sıvısında canlı kalma, otoagregasyon ve hidrofobisite yetenekleri belirlenmiştir. Ayrıca bu LAB suşlarının antimikrobiyal aktiviteleri, proteolitik özellikleri ve glukozdan gaz üretimleri de belirlenmiştir.

Peynirden izole edilen ve gluten hidrolize eden 4 LAB suşunun (11P, 16P, 38P ve 104P), yukarıda belirtilen temel probiyotik nitelikleri ve diğer testleri önceden belirlenmiş olduğu için, bu çalışmada sadece otoagregasyon ve hidrofobisite testleri yapılmıştır.

3.2.7.1. Düşük pH'larda canlı kalma yetenekleri

LAB suşlarının farklı pH'larda canlı kalabilme yeteneklerini belirlemek için; pH'ları 1, 2, 3 ve 4 olan 5 ml MRS broth besiyeri hazırlanmıştır. MRS broth (pH5,7) besiyerinde aktiflenen kültürlerin hücre yoğunlukları Mc Farland 1' e göre (3×10^8 kob/ml) göre hücre ayarlanmıştır. Aynı zamanda pH5,7 kontrol grubu olarak ayrıca çalışılmıştır. Hücre yoğunluğu ayarlanan kültürler ayrı ayrı MRS broth pH1, pH2, pH3 ve pH4 besiyeri olan tüplere 50 µl ekilmiştir. 0., 1., 2., 3., 4. ve 8. saatlerde her bir tüpten örnek alıp MRS agar besiyerin bulunan petrilere yayma ekimler yapılmıştır. Petriler 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda petrillerdeki büyüme varlığı gözlemlenmiştir ve kayıt edilmiştir. Çalışma her suş için 2 paralel olarak çalışılmıştır (Abanoz, 2014).

3.2.7.2. Safrada canlı kalma yetenekleri

İzole edilmiş LAB suşlarının %0,3 ve %0,6 oranında safra içeren çift kuvvetli MRS broth besiyerinde canlı kalabilme yeteneklerini belirlenmiştir.

Çift kuvvetli MRS broth besiyeri vidalı kapaklı tüplere %0,3 ve %0,6 oranında safra içerecek şekilde ayrı ayrı her suş için hazırlanmıştır. MRS broht pH5,7 besiyerinde aktiflenen kültürlerin Mc Farland 1'e (3×10^8 kob/ml) göre hücre yoğunlukları ayarlanmıştır.

Aynı zamanda pH5,7 kontrol grubu olarak ayrıca çalışılmıştır. Hücre yoğunluğu ayarlanan kültürler ayrı ayrı tüplere %0,3 ve %0,6 oranında safra bulunan çift kuvvetli MRS broth besiyeri olan tüplere 50 µl ekimleri yapılmıştır. 0., 1., 2., 3., 4. ve 8. saatlerde her bir tüpten örnek alıp MRS agar besiyerin bulunan petrilere yayma ekimler yapılmıştır. Petriler 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda petrillerdeki büyüme varlığı gözlemlenmiştir ve kayıt edilmiştir. Çalışma her suş için 2 paralel olarak çalışılmıştır (Abanoz, 2014).

3.2.7.3. Yapay mide sıvısında canlı kalma

LAB suşlarının pH’ı 2 ve 3 olan yapay mide sıvısında canlı kalabilme yetenekleri belirlenmiştir. Bunun için vidalı kapaklı tüplere 5 ml olacak şekilde, pH’ ı 2 ve 3 olan yapay mide sıvısı hazırlanmıştır. MRS broht pH5,7 besiyerinde aktiflenen kültürlerin Mc Farland 1’ e (3×10^8 kob/ml) göre hücre yoğunlukları ayarlanmıştır. Aynı zamanda pH5,7 kontrol grubu olarak ayrıca çalışılmıştır. Hücre yoğunluğu ayarlanan kültürler ayrı ayrı mide sıvısı pH2 ve mide sıvısı pH3 ortamı olan tüplere 50 µl ekimleri yapılmıştır. 0., 1., 2., 3., 4. ve 8. saatlerde her bir tüpten örnek alıp MRS agar besiyerin bulunan petrilere yayma ekimler yapılmıştır. Petriler 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda petrillerdeki büyüme varlığı gözlemlenmiştir ve kayıt edilmiştir. Çalışma her suş için 2 paralel olarak çalışılmıştır (Abanoz, 2014).

3.2.7.4. Otoagregasyon yetenekleri

Otoagregasyon yeteneği, probiyotik olarak adlandırılan aynı tür LAB suşunun bir araya gelerek bağırsakta koloni oluşturması ve patojenlere karşı bağırsak sistemine yarar sağlamaları açısından önem kazanmaktadır (Abouloifa vd., 2020). İzolasyon ile elde edilen 39 LAB suşundan farklı kaynaklardan ve farklı morfolojiye sahip olmasına dikkat edilerek seçilen 8 tane LAB suşunun ve daha önce peynirden izole edilmiş 4 tane LAB suşunun otoagregasyon özellikleri bu çalışma ile belirlenmiştir. Çalışmada suşlar MRS broth besiyerinde 35°C’de 18-24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürler 6000 rpm’de +4 °C’de 10 dk santrifüjlenmiştir, süpernatant atılmıştır. Geriye kalan hücre pelletleri 2 kez PBS (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi) ile yıkanmıştır. Yıkanan hücrelerin yine PBS ile hücre süspansiyonları 600 nm’de 1.0 ± 0.05 absorbans verecek şekilde ayarlanmıştır.

Daha sonra 37°C’de 4 saat bekletilmiştir. 4 saat sonunda üstte kalan sulu faz dikkatlice çekip 600 nm’de absorbansları ölçülmüştür ve kayıt edilmiştir (Rokana vd., 2018; Bilginer ve Çetin, 2019; Dlamini vd.,2019).

Otoagregasyon yetenekleri aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Otoagregasyon: } [(OD_1-OD_2)/OD_1] \times 100$$

OD₁: Ölçülen ilk absorbans değeri

OD₂: 4 saat sonraki absorbans değeri

3.2.7.5. Hidrofobisite yetenekleri

LAB’ların hidrofobisite özelliklerine sahip olması bağırsağın iç duvar yüzeyinde patojenlere karşı duvar görevi görerek savunma mekanizması oluşturması ve bağırsak yapısının bozulmadan kalabilmesi için oldukça önemlidir. İzolasyon ile elde edilen 39 LAB suşu arasından farklı kaynaklardan ve farklı morfolojiye sahip olmasına dikkat edilerek 8 tane LAB suşunun ve daha önce peynirden izole edilmiş 4 tane LAB suşunun hidrofobisite kapasitesi bu çalışma ile belirlenmiştir. Çalışmada suşlar MRS broth besiyerinde 35°C’de 18-24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürler 6000 rpm’de +4 °C’de 10 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılmıştır. Geriye kalan hücre pelletleri 2 kez PUM (Fosfat üre magnezyum sülfat) tamponu ile yıkanmıştır. Yıkanan hücrelerin yine PUM tamponu ile hücre süspansiyonları 600 nm’de 1,0±0,05 absorbans verecek şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra temiz bir cam tüpe 6 ml hücre süspansiyonundan eklenmiştir ve üzerine 2 ml xylene konulmuştur. Tüplerin ağzı kapatılmıştır ve 37°C’de 10 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bütün tüpler 15 sn vortekslenmiştir. Ardından faz ayırımı için 37°C’de 20 dk inkübe edilmiştir. 20 dk sonunda üstte kalan faz dikkatlice çekilip 600 nm’de absorbans kuvars küvet kullanılarak ölçülmüştür ve kayıt edilmiştir (Rosenberg vd., 1980; Rokana vd., 2018).

Hidrofobisite yetenekleri aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Hidrofobisite : } [(OD_1-OD_t)/OD_1] \times 100$$

OD₁: Ölçülen ilk absorbans değeri

OD_t: t zaman sonraki sulu fazın absorbans değeri

3.2.7.6. LAB'ların antimikrobiyal aktivitesi

Antimikrobiyal aktivitesi belirlenmek istenen 39 LAB suşunun 24 saatlik kültürleri için önceden hazırlanmış MRS broth besiyerine ekimleri yapılmıştır. Aynı zamanda çalışmada kullanılacak test mikroorganizmaları da büyüme gösterdikleri besiyerlerine göre (NB ve MEB) ekimleri yapılarak aktiflenmiştir. MEA ve MHA besiyerleri hazırlanmıştır ve petrilere dökülmüştür. Petriler 3 paralel olarak etiketlenmiştir. 24 saatlik kültürlerin hücre yoğunlukları ekim yapılmamış sıvı besiyerleri ile Mc Farland 0,5'e ($1,5 \times 10^8$ kob/ml) göre ayarlanmıştır.

Hücre yoğunlukları ayarlanan test mikroorganizmalarının 10^{-2} dilüsyonu hazırlanmıştır. Petrilere 0,1ml konulup Drigalski spatülü ile yayma ekimi gerçekleştirilmiştir. Oda sıcaklığında yüzeyi hafif kuruyan petrilere Mc Farland 0,5'e ($1,5 \times 10^8$ kob/ml) göre hücre yoğunluğu ayarlanan LAB suşları damla ekim yöntemi ile 10 µl ekilmiştir. Ekimi yapılan petrilere test mikroorganizmalarının büyüme sıcaklıklarına göre (28°C ve 37°C) 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucundan inhibisyon zonu gözlemlenen petrilere zon çapları kumpas yardımı ile ölçülüp kayıt edilmiştir (Ertekin ve Çon, 2014).

3.2.7.7. LAB'ların proteolitik özelliklerinin belirlenmesi

Skim milk hidrolizi

Otuzdokuz LAB suşunun proteolitik aktivitesini belirlemek için, kültürler MRS broth besiyerinde 18-24 saat aktiflendikten sonra 6000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmıştır. Serum fizyolojik ile bakteri hücreleri bir kez yıkanmıştır. LAB kültürlerinin Mc Farland 0,5'e ($1,5 \times 10^8$ kob/ml) göre hücre yoğunluğu ayarlanmıştır. Daha sonra önceden petrilere hazırlanan Skim milk agarlı besiyerlerine 5 µl spot ekimleri yapılmıştır. Her kültür için 3 paralel olarak çalışılmıştır. 35°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra petrilere oluşan zon çapları mm cinsinden ölçülerek proteolitik aktivite özellikleri belirlenmiştir (Franciosi vd., 2009).

Kazein hidrolizi

Kazein hidrolizini test etmek amacı ile kazein agar besiyeri hazırlanmıştır. Kazein hidrolizi test edilecek 39 LAB suşunun MRS broth besiyerinde 35°C'de 18 saatlik kültürleri hazırlanmıştır. 18 saatlik kültürler 6000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir ve hücrelerin hücre yoğunlukları SF ile Mc Farland 0,5'e ($1,5 \times 10^8$ kob/ml) göre ayarlanmıştır. 39 LAB suşunun 3 paralel çalışılacak şekilde petrilere etiketleri yapılmıştır. Ardından damla ekim yöntemi kullanılarak her bir suşun petriye 10 µl ekimi yapılmıştır. Ekimi yapılan petriler 35°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol suşu olarak *Pseudomonas aeruginosa* suşu ile çalışılmıştır ve 28°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Negatif kontrol suşu olarak ise *E. coli* ile çalışılmıştır ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir (Ramati, 2017).

Jelatin hidrolizi

Jelatin hidrolizi yeteneği belirlenecek 39 LAB suşunun MRS broth besiyerinde 35°C'de 18 saatlik kültürleri hazırlanmıştır. On sekiz saatlik kültürler 6000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir ve hücrelerin hücre yoğunlukları SF ile Mc Farland 0,5'e ($1,5 \times 10^8$ kob/ml) göre ayarlanmıştır. LAB suşları +4°C'de dik olarak dondurulmuş jelatin agar besiyeri içeren tüplere, saplama yöntemi ile, üç paralel halinde ekilmiştir. Ekimi yapılan tüpler 35°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol suşu olarak *Staphylococcus aureus* suşu çalışılmış ve 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bütün tüpler +4°C'de 1 saat bekletilmiştir. Bir saatin sonunda jelatin agar besiyerinin sıvı halde ve katılaşmadığı görülen tüpler jelatinaz hidrolizi pozitif (+) olarak değerlendirilmiştir. Negatif (-) tüplerde ise sıvı jelatin agar besiyerinin tekrar katılaştığı görülmüştür. Ekim yapılmamış tüpler de kontrol olarak çalışmaya dahil edilmiştir (Ekpenyong, 2016).

3.2.7.8. Glukozdan gaz üretimi

Glukoz fermantasyonu ile LAB suşlarının glukozdan gaz üretilip üretilmediğini test etmek için MRS broth besiyerleri hazırlanmıştır ve vidalı kapaklı cam tüplere 5 ml dağıtılmıştır.

Ayrıca durham tüpü de bu besiyerini içeren tüplerin içine birer tane konulmuş ve steril edilmiştir. Çalışma 3 paralel olarak yürütülmüştür. 24 saatlik aktiflenmiş LAB kültürlerinin Mc Farland 0,5'e ($1,5 \times 10^8$ kob/ml) göre hücre yoğunluğu ayarlanmıştır ve 50 µl alınarak durham tüpü bulunan besiyerlerine ekim yapılmıştır. Ardından 35°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda durham tüplerindeki gaz çıkışının varlığına bakılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Glukoz fermentasyonu ile mikroorganizmalar iki grupta değerlendirilir. Sadece laktik asit üreten mikroorganizmalar homofermentatif, glukozu birden çok ürüne (asetik karbon dioksit, asit, etanol, formik asit gibi) fermente edebilen mikroorganizmalar ise heterofermentatiftir (Dallal vd., 2017).

3.2.8 Gluten hidrolizi için optimum koşulların belirlenmesi

3.2.8.1. Aerobik ve anaerobik koşullarda gluten hidrolizi

Seçilen 12 LAB suşunun gliadin hidrolize etme yetenekleri belirlendikten sonra, bunların gluten hidrolize edebilmeleri için optimum koşullar belirlenmiştir. İlk olarak aerobik ve anaerobik ortam koşullarında üreme ve gluten hidrolizi yeteneklerine bakılmıştır. MRS broth besiyerinde aktiflenen toplam 12 LAB suşu 35°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında Mc Farland 0,5 standartına göre kültür yoğunlukları ayarlanmış ve adaptasyon amacıyla içinde GB-2 besiyeri bulunan tüplere 50 µl ekim yapılmıştır. GB-2 besiyeri tüplerine ekimi yapılan suşlar 35°C'de 24 saat aerobik ve anaerobik ortam koşulunda inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra GA-2 besiyeri hazırlanan petrilere 10 µl damla yöntemi ile ekim yapılmıştır. Petrilere tekrar 35°C'de 24 saat aerobik ve anaerobik ortamda inkübasyona bırakılmıştır ve inkübasyon sonucu petrideki zon çapları ölçülerek mm cinsinden kayıt edilmiştir.

3.2.8.2. Farklı pH düzeylerinde gluten hidrolizi

Mide ve bağırsak pH'ı dikkate alınarak, gluten hidrolizi için pH3 - pH8 aralığı kullanılmıştır (Fallingborg, 1999). Belirlenen bu pH'lar ile gluten içeren ortamda LAB'ların canlı kalma yetenekleri çalışılmıştır. Kızıltan unundan izole edilen 23 ve 24 suşlar (kok formundaki LAB'lar) Siyez unundan izole edilen 68 ve 107 no.lu suşlar (basil-kokobasil formundaki suşlar) MRS broth besiyerinde 35°C'de 24 saat aktiflenmiştir.

Aktiflenen suşlar kültür yoğunluğu Mc Farland 1 standartına göre ayarlanmıştır. Vidalı kapaklı cam tüplere 5 ml hazırlanan GB-2 besiyerine (pH=5,7) ekimleri yapılarak 35°C'de 24 saat ikinci aktiflemeleri yapılmıştır. 50 ml GB-2 besiyerleri ayrı ayrı pH3, pH4, pH5, pH6, pH7 ve pH8'e ayarlanmıştır. 3 paralel olarak yapılan çalışmada 0., 2., 4. 8., 16., 24., 32. ve 48. saatler dilimlerinde örnekler alınmıştır ve pH'ları kaydedilmiştir. Ayrıca aynı anda 10 µl örnekler alınmış ve GA-2 besiyerine damlatılmış ve 35°C'de 24 saat inkübasyondan sonra zon çapları ölçülmüştür. Daha sonra 23 ve 107 no.lu (Siyez ve Kızıltan unundan izole edilen kok ve basil formda iki suş) LAB suşları, pH'ı 3 ve pH'ı 4 olan 50 ml GB-2 besiyerlerine ekilmiş ve 35°C'de 48 saat inkübe edilmiştir.

Mide pH'ı göz önünde bulundurularak pH3 ve pH4 seçilmiştir. İnkübasyonun başında ve 2., 4. 8., 16., 24., 32. ve 48. saatlerinde hücre kültüründen alınan 1 ml örnekler MRS agar yüzeylerine yayma ekim yöntemiyle ekilmiş ve 35°C'de 24 saat inkübasyondan sonra koloni sayımı yapılarak sonuçları kayıt edilmiştir. Ayrıca aynı anda 10 µl örnekler GA-2 besiyerine ekimler yapılmış ve zon çapları ölçülmüştür. Böylece, GB-2 besiyerinde iki suşun büyüme eğrisi çıkarılmış ve bu büyüme eğrisindeki zaman aralıklarına karşılık gelen hidroliz zon çapları ölçülmüştür.

3.2.9. Seçilen suşlar ile Enzim Bağlı İmmünosorbent (ELISA) test kiti kullanılarak 33-mer peptid degradasyonunun belirlenmesi

Seçilen probiyotik LAB suşlarının 33-mer peptid hidrolizi yapabildiğini belirleyebilmek için bu test yapılmıştır. Bu amaçla AgraQuant Gluten G12 test kiti kullanılmış ve üreticinin talimatları uygulanmıştır. Bunun için un örneğine doğrudan LAB suşları inoküle edilmiş ve 37°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 0,25 g örnek alınarak test uygulanmış, kontrole göre 33-mer peptid konsantrasyonundaki düşüş, bu peptidin hidrolize edildiğini işaret etmiştir.

Deney aşağıdaki aşamalar takip edilerek yapılmıştır:

1. Örnek 0,25 g tartılıp, üzerine 2,5 ml kitin içerisinden çıkan ekstraksiyon tamponundan eklenmiştir. Vortekslenerek karıştırılmıştır.
2. Ekstraktları 50°C'de 40 dk inkübe edilmiştir. Belirli aralıklarla vortekslenmiştir.

3. İnkübasyondan sonra ekstraları soğutup sonra üzerine 7,5 ml %80'lik etanol eklenip vortekslenmiştir.
4. Oda sıcaklığında 120 rpm'de 60 dk çalkalanmıştır.
5. Partikül çözeltisi ile süpernatant arasında berrak sulu bir faz elde etmek için 2000 g'de 10dk oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası süpernatantı (ekstraktı) yeni temiz bir tüpe alır.
6. Kit içerisindeki antikör kaplı 8'li striplerin ilk kuyusuna standartlardan (0, 4, 20, 80 ve 200 ppm) 100 µl konmuştur. Geriye kalan kuyulara da çalışılacak ekstralar sırasıyla 100 µl konmuştur.
7. Oda sıcaklığında 20 dk inkübe edilmiştir.
8. Mikrokuyulardaki örnekler atık kabına boşaltılıp yıkama tamponu ile 5 kez yıkanmıştır.
9. Beşinci yıkamadan sonra havlu kağıt ile kurulanmıştır.
10. Yeşil kapaklı şişedeki konjugattan bir miktar ayrı bir yere boşaltılıp her kuyuya 100 µl konmuştur.
11. Oda sıcaklığında 20 dk inkübe edilmiştir.
12. Mikrokuyulardaki örnekler atık kabına boşaltılıp yıkama tamponu ile 5 kez yıkanmıştır.
13. Beşinci yıkamadan sonra havlu kağıt ile kurulanmıştır.
14. Mavi kapaklı şişedeki substrattan bir miktar ayrı bir yere boşaltılıp her kuyuya 100 µl konmuştur.
15. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dk inkübe edilmiştir.
16. Kırmızı kapaklı şişedeki reaksiyonu durdurucu solüsyondan bir miktar ayrı bir yere boşaltılıp her kuyuya 100 µl konmuştur.
17. Kuyular ELISA reader ile 450 nm'de okunmuştur.

3.2.10. *G. mellonella* larvaları ile *in vivo* enfeksiyon denemesi

LAB suşları ile yapılan gluten/gliadin/33-mer peptid hidrolizi çalışmalarından elde edilen sonuçlar ve probiyotik nitelikleri dikkate alınarak 107 no.lu suş seçilmiş ve patojenitesi belirlenmiştir.

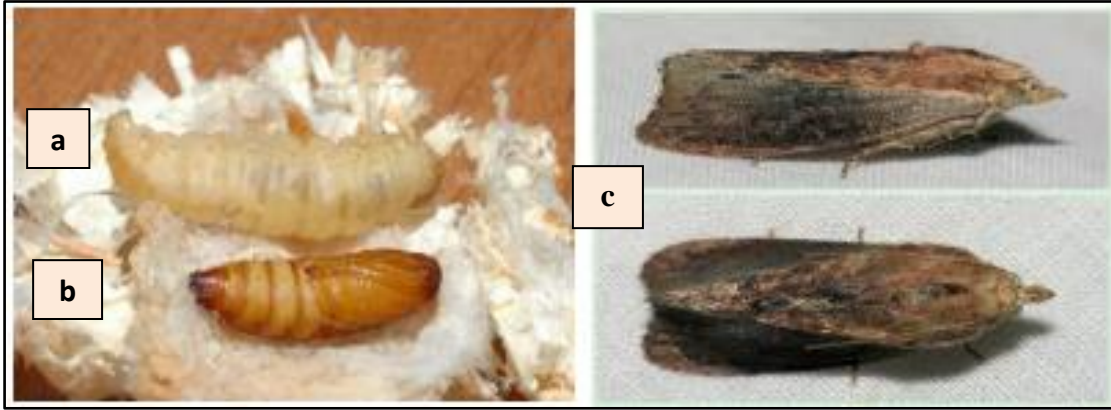
Bu *in vivo* test ile ortaya konmak istenen şey, öncelikle probiyotik olarak kullanım olanağını araştırdığımız 107 no.lu LAB suşunun, konakta enfeksiyon meydana getirme riskini belirlemektir. Patojen suş olarak *E. coli* O157:H7 kullanılmıştır.

Larvaların dolaşım sistemine 107 no.lu suş ve/veya *E. coli* O157:H7 enjekte edilmiş ve 24-48 saat sonunda canlı kalan, ölen ve inflamasyon belirtisi gösteren larvaların sayısı kayıt edilmiştir. Sonuç olarak *G. mellonella* larvalarının hayatta kalım yüzdeleri hesaplanmıştır.

3.2.10.1. *G. mellonella* larvalarının çoğaltılması

Çalışmalarda kullanılan konak kültür, Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyolojisi laboratuvarında bulunan *G. mellonella* larva, pupa ve ergin bireylerin konak stok kültüründen alınması ile oluşturulmuştur (Şekil 3.2). Pupa evresini tamamlayan 3 dişi ve 3 erkek *G. mellonella* erginlerinin yumurta bırakması için 2,5 g içi boş siyah petek bulunan, 1 litrelik (L) cam kavanozlara konulması ile süksesif kültür baştan oluşturulmuştur (Şekil 3.3).

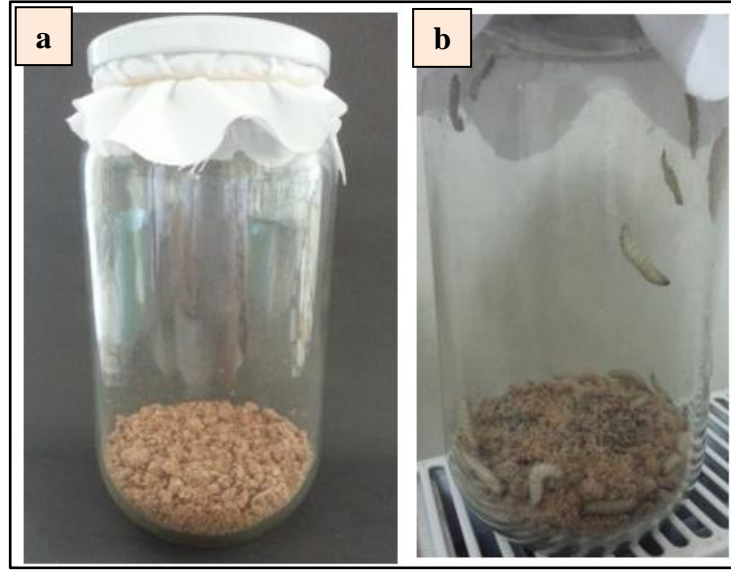
Cam kavanozların ağızları hava sirkülasyonunu engellemeyecek şekilde bez örtülerek, paket lastiği ile sabitlenmiştir. Sonrasında larvaların dışarı kaçmasını engellemek için cam kavanozların ağızları üzerine delikler açılan metal kavanoz kapakları ile kapatılmıştır. Cam kavanozlar laboratuvarında uygun şartlar sağlanarak ($28 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık, nem ve 12: 12 saat (A:K) fotoperiyot) tutulmuştur. Siyah petek üzerine dişi *G. mellonella*'lar tarafından bırakılan yumurtaların açılmasıyla kavanozlara önceden hazırlanmış olan Bronskill (1961) tarafından önerilen sentetik besinin Sak vd., (2006) tarafından kepek miktarının modifiye edilmiş hali olan sentetik besin eklemesi yapılmıştır (Şekil 3.4). Üç günde bir cam kavanozların bakımı yapılmıştır ve yarı sentetik besin takviye edilmiştir. Bir cam kavanozdaki larva popülasyon yoğunluğuna göre larvalar iki kavanoza bölünmüştür. Cam kavanozlarda büyüyen son evre larvaları, pupalaşmalarını kolaylaştırmak için akordiyon şeklinde katlanıp kavanozların içine yerleştirilmiş kurutma kağıtları bulunan başka 1 L' lik kavanozlara alınmıştır ve yalnızca delinmiş metal kapaklarla kapatılmıştır (Şekil 3.5). Ergin kelebekler stok kültürün devamı ve doz deneme çalışması için yapılacak süksesif kültürün oluşturulması için kullanılmıştır.



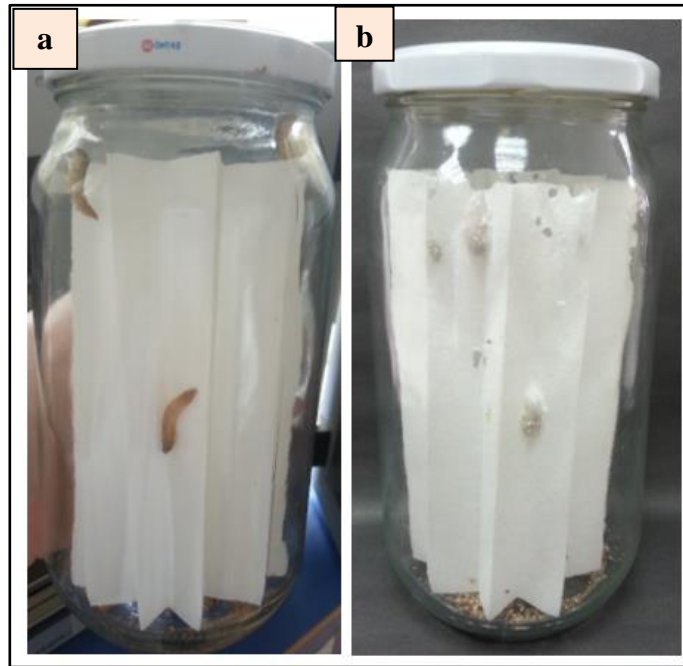
Şekil 3.2 *G. mellonella* (a: larva b: pupa c:ergin bireyler) (Özbek, 2012)



Şekil 3.3 *G. mellonella* ergin bireyler ve yumurta bırakması için kullanılan içi boş siyah petek



Şekil 3.4 *G. mellonella* larvası için önerilen sentetik besin. a:modifiye edilmiş hali olan sentetik besin b: *G. mellonella* larvalar



Şekil 3.5 *G. mellonella* (a:son evre larvaları b: kozaya girmiş hali)

3.2.10.2. *G. mellonella* enfeksiyon testi için doz çalışması

Bu test probiyotik suşun konakta enfeksiyona neden olma potansiyelini ortaya koymak için yapılmıştır.

Çalışmada pozitif kontrol olarak patojen *E. coli* O157:H7 suşu kullanılmıştır. Enterik bakteriler ailesinden olup, memeli hayvanların bağırsak mikrobiyotasında bulunan, basil formda gram negatif bir bakteridir. *E. coli* O157:H7 suşu, enteropatojenik özellikler taşır ve Şiga toksinleri salgılar. Yol açtığı hastalık hemorajik kolit olarak adlandırılır. *E. coli* O157:H7 için kullanılan hücre yoğunluğu dozu; 10^3 kob/ml, 10^4 kob/ml ve 10^5 kob/ml; 107 no.lu suş için kullanılan hücre yoğunluğu dozu ise; 10^6 kob/ml, 10^7 kob/ml, 10^8 kob/ml ve 10^9 kob/ml şeklinde hazırlanmıştır. Her bir doz grubu 3 paralel olarak çalışılmıştır. Her bir grup için 16 sağlıklı larva seçilmiştir. Ayrıca hiçbir muamele görmemiş grup ve hücre yoğunluklarını ayarlamak için kullanılan serum fizyolojik enjekte edilen grup kontrol grupları olarak çalışmaya dahil edilmiştir.

E. coli O157:H7 suşu NB besiyerinde 37°C 'de 24 saat aktiflenirken, 107 no.lu LAB suşu MRS broth besiyerinde 35°C 'de 24 saat aktiflenmiştir. İnkübasyon sonunda iki suş 6000 rpm de 5 dk santrifüjlenmiştir.

Süpernatant atılmış bakteri hücreleri (pellet) 1 kez SF (Serum fizyolojik) ile yıkanmıştır. Daha sonra hücre pelletleri SF ile süspansiyon edilmiştir ve belirlenen hücre yoğunlukları Mc Farland 0,5 standartına göre spektrofotometrede (Shimadzu UV-2450 UV-VIS) ayarlanmıştır.

Cam petrilere gruplar halinde ayrılan larvalar etiketlenerek hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.6). Ayrıca steril cam petrilere 10 µl yoğunluğu ayarlanmış hücre kültürleri damlatılıp, 1ml'lik steril insülin iğneleri ile çekilerek enjeksiyon işlemi için hazırlanmıştır. Larvaları enjeksiyon işlemine hazırlamak için ventral bölgesinde yer alan proleglerin (karın çıkıntıları) olduğu yerler steril eküvyon yardımı ile %70'lik etil alkol kullanılarak steril edilmiştir (Şekil 3.7). Steril edilen her larva grubuna uygun konsantrasyondaki dozlar sırayla enjekte edilmiştir (Şekil 3.8). Enjeksiyon sonrası bütün gruplar 37°C 'de 24-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sırasında her gün canlı, hasta ve ölü larva sayıları fotoğraflanarak kayıt edilmiştir.

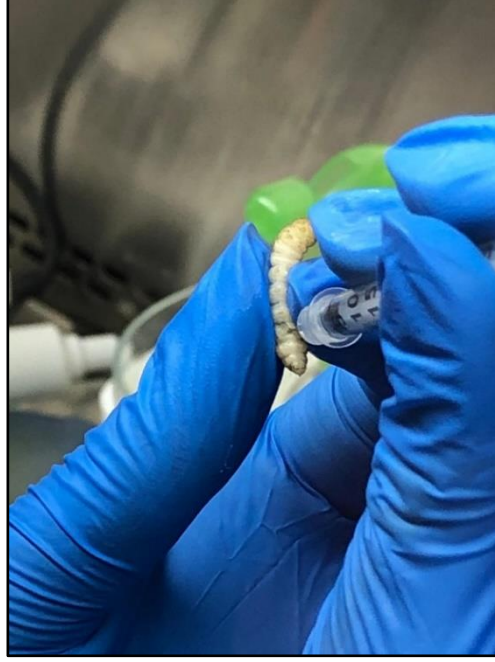
Bu çalışma sonunda probiyotik suşun ve pozitif kontrol olan *E. coli* O157:H7 LD₅₀ değeri belirlenmiş ve daha sonra yapılacak olan koruyucu ve tedavi edici etki belirleme çalışmalarında bu dozlar kullanılmıştır.



Şekil 3.6 Cam petrilere gruplar halinde ayrılan *G. mellonella* larvaları



Şekil 3.7 *G. mellonella* larvası prolegleri ve %70'lik etil alkol ile steril edilmesi



Şekil 3.8 Steril edilen *G. mellonella* larvasına enjeksiyon işlemi

3.2.10.3. *G. mellonella* üzerine tedavi edici ve koruyucu etki çalışması

Yapılan doz denemesi çalışmasından sonra *G. mellonella* larvalarına enjekte edilecek patojen *E. coli* O157:H7 suşu için deneyde larvalarda LD₅₀ değerine ulaştığımız doz olan 10³ kob/ml'ye karar verilmiştir.

Probiyotik suş olarak kullanılan koko-basil formda gram pozitif bir LAB olan 107 no.lu suşun hücre yoğunluğu dozu ise; 10³ kob/ml ve 10⁶ kob/ml olarak iki farklı doz belirlenmiştir. Her bir doz grubu 3 paralel olarak çalışılmıştır. Her bir grup için 16 sağlıklı larva seçilmiştir. Ayrıca hiçbir muamele görmemiş grup ve hücre yoğunluklarını ayarlamak için kullanılan serum fizyolojik enjekte edilen grupta kontrol grupları olarak çalışmaya dahil edilmiştir.

E. coli O157:H7 suşu NB besiyerinde 37°C'de 24 saat aktiflenirken, 107 no.lu LAB suşu MRS broth besiyerinde 35°C'de 24 saat aktiflenmiştir. İnkübasyon sonunda iki suş 6000 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılmıştır. Bakteri hücreleri 1 kez SF ile yıkanmıştır. Daha sonra hücre pelletleri SF ile süspansiyon edilmiştir ve belirlenen hücre yoğunlukları Mc Farland 0,5 standartına göre spektrofotometrede (Shimadzu UV-2450 UV-VIS) ayarlanmıştır.

Cam petrilere çalışma gruplarına göre *G. mellonella* larvaları alınmıştır. Larvaları enjeksiyon işlemine hazırlamak için ventral bölgesinde yer alan proleglerin (karın çıkıntıları) olduğu yerler steril eküvyon yardımı ile %70'lik etil alkol kullanılarak steril edilmiştir (Şekil 3.7).

1. deney grubu olarak probiyotik özellikleri olduğunu bildiğimiz 107 no.lu LAB suşunun *E. coli* O157:H7 karşı koruyucu etkisine bakılmıştır. Bunun için hücre yoğunluğu ayarlanan iki bakteri kültüründen ilk önce *G. mellonella* larvasının sol proleg açıklığından 5 µl 107 no.lu LAB suşu enjekte edilmiştir. Ardından 2 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 2 saat sonunda sağ proleg açıklığından *E. coli* O157:H7 suşu 5 µl enjekte edilmiştir. Enjeksiyon sonrası 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat inkübasyon sonrası canlı, hasta ve ölü larva sayıları fotoğraflanarak kayıt edilmiştir.

2. deney grubu olarak ise 107 no.lu LAB suşunun *E. coli* O157:H7 suşuna karşı tedavici edici bir özelliğinin olup olmadığını belirlenmiştir. Hücre yoğunluğu ayarlanan iki bakteri kültüründen ilk önce *E. coli* O157:H7 suşu sol proleg açıklığından 5 µl enjekte edilmiştir. Daha sonra 2 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 2 saat sonunda *G. mellonella* larvasının sağ proleg açıklığından 5 µl 107 no.lu LAB suşu enjekte edilmiştir.

Enjeksiyon sonrası 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat inkübasyon sonrası canlı, hasta ve ölü larva sayıları fotoğraflanarak kayıt edilmiştir (Vilela, 2015).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Un, ekşi maya ve hamur örneklerinden mikroorganizma izolasyonu, saflaştırması ve saf kültürlerin stoklanması

Un, ekşi maya ve hamur örneklerinden yapılan izolasyon sonucunda 113 adet suş elde edilmiştir. Bunların 54 tanesi maya ve 59 tanesi gram pozitif bakteridir. Bu bakterilerden 29 tanesi basil formunda, 23 tanesi kok formunda ve 7 tanesi koko-basil formundadır.

4.2. GA-1 besiyeri kullanarak suşların gluten hidrolize etme yeteneğinin belirlenmesi

Un, ekşi maya ve hamur örneklerinden izole edilen gram pozitif bakteri suşlarının ve mayaların gluten hidrolizi yeteneği belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Bu aşamada çalışmaya, daha önceki bir çalışma kapsamında izole edilmiş ve LAB olduğu belirlenmiş 60 adet gram pozitif bakteri suşu da dahil olmuştur. Toplam 119 gram pozitif bakteri suşunun ve 54 maya suşunun gluten hidroliz yeteneği belirlenmiştir. GA-1 besiyerinin içeriğinde, azot kaynağı olarak buğday gluteni bulunmaktadır ancak bunun yanı sıra tripton ve maya özütü gibi diğer azot kaynakları da vardır. Gluten hidrolizini belirleyebilmek için Coomassie Blue protein boyaması yöntemi kullanılmıştır. Boyama sonrası koloni çevresinde boyanmamış zonlar görülmesi gluten hidrolizini işaret etmiştir. Sonuç olarak 43 adet bakteri suşunun gluten hidrolize etme yeteneği olduğu belirlenmiştir. Bu suşların 20 adedi un, 17 adedi ekşi maya ve 2 adedi hamur örneklerinden gelmiştir. Önceki çalışmalardan izole edilen LAB'ların ise 4 adedi gluteni hidrolize edebilmiştir. Başka bir çalışmanın konusunu oluşturacağı düşünüldüğünden, gluten hidrolize eden maya suşları çalışmanın sonraki aşamalarına dahil edilmemiş, sadece gram pozitif bakteri suşları çalışmaya devam edilmiştir.

Çizelge 4.1 Un, ekşi maya ve hamur örneklerinden izole edilen gram pozitif bakteriler, mayalar ve önceki çalışmalarda peynirden izole edilmiş LAB'nin GA-1 besiyerinde gluten hidrolize etme yetenekleri

İzolasyon kaynağı	Gluten hidrolize eden suş sayısı/toplam suş sayısı	
	Gram pozitif bakteri	Maya
Un 1 (Kızıltan)	4/5	-
Un 2 (Siyez)	16/16	3/3
Ekşi maya 1 (Ticari)	0/13	15/15
Ekşi maya 2 (Kızıltan)	15/16	24/24
Ekşi maya 3 (Siyez)	2/2	5/5
Topçuoğlu ekmek hamuru	2/7	7/7
Peynirden izole edilen LAB	4/60	-

4.3. Gluten hidrolize etme yeteneği belirlenen suşlardan LAB olanlarının seçimi

Bu çalışmada amacımız un, ekşi maya ve hamur örneklerinden izole ettiğimiz gluten hidrolize eden 59 gram pozitif bakterilerin LAB olup olmadığını belirlemektir. Bu amaçla öncelikle; katalaz enzimi varlığı, aerobik/anaerobik koşullarda üreme, spor oluşturma, hareketlilik gibi temel testler yapılmıştır. Çalışmanın bundan sonraki aşamalarına hareketsiz, spor oluşturmayan ve katalaz enzim aktivitesi bulunmayan gram pozitif suşlar ile devam edilmiştir. Bu suşlar muhtemel LAB olarak kabul edilmiş ve gluten hidrolizi açısından en aktif olanları seçilerek, bunların probiyotik aktiviteleri de belirlenmiştir. Peynirden izole edilmiş suşların LAB oldukları daha önceden belirlenmiş olduğundan, çalışmanın bu aşamasına dahil edilmemiştir. Aşağıda, izole edildikleri örneklere göre gram pozitif bakterilere LAB olduklarını belirlemek amacıyla yapılan test sonuçları verilmiştir.

Önce katalaz testi yapılmış, spor oluşturma ve hareketlilik testleri sadece katalaz testi negatif çıkan, yani katalaz enzim aktivitesi olmayan suşlara uygulanmıştır. Katalaz enzimi H_2O_2 'yi; O_2 ve H_2O 'ya parçalayan enzimdir, aerobik canlılarda bulunur.

LAB'lar ise aerotoleranttır bu nedenle katalaz enzimleri yoktur. LAB'ların seçiminde kullanışlı bir testtir. Katalaz testine ilişkin olarak elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2 - Çizelge 4.8'de sunulmuştur.

Ticari ekşi kuru hamur mayasından (Dr. Qetker) toplam 13 bakteri (69, 70, 75, 76, 86, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 ve 98 no.lu suşlar) izole edilmiştir. Bu bakterilerin aerobik/anaerobik üreme yeteneği, morfolojik özellikleri ve katalaz testi sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Ticari ekşi kuru hamur mayasından (Dr. Qetker) izole edilen bakterilerin morfolojisi, aerobik/anaerobik üreme yeteneği ve katalaz testi sonuçları

Suş No	İzolasyon Kodu	Hücre morfolojisi	Aerobik üreme	Anaerobik üreme	Katalaz Testi	
					%30'luk H_2O_2	%3'lük H_2O_2
69	10p-8c-a	Kok	+	+	+	+
70	10p-8c-d	Kok	+	+	+	+
75	10p-2a-a	Kok	+	+	+	+
76	10p-2a-b	Kok	+	+	+	+
86	10p-8c-b	Kok	+	+	+	+
91	10p-2a-c	Kok	+	+	+	+
92	10p-8a	Kok	+	+	+	+
93	10p-8b	Kok	+	+	+	+
94	10p-8c	Kok	+	+	+	+
95	10p-8d	Kok	+	+	+	+
96	10p-8e	Kok	+	+	+	+
97	10p-8f	Kok	+	+	+	+
98	10p-8g	Kok	+	+	+	+

Kızıltan unundan hazırlanıp Fethiye-Muğladan gönderilen ekşi mayadan 15 tane bakteri suşu izole edilmiştir. Bunlar 1, 2, 3, 4, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 28, 33, 34, 39 ve 41 no.lu suşlardır. Bu bakterilerin aerobik/anaerobik üreme yeteneği, morfolojik özellikleri ve katalaz testi sonuçları Çizelge 4.3' de verilmiştir.

Çizelge 4.3 Ekşi mayadan (Fethiye) izole edilen bakterilerin morfolojisi, aerobik/anaerobik üreme yeteneği ve katalaz testi sonuçları

Suş No	İzolasyon Kodu	Hücre morfolojisi	Aerobik üreme	Anaerobik üreme	Katalaz Testi	
					%30'lük H ₂ O ₂	%3'lük H ₂ O ₂
1	4p-4a	Basil	+	+	-	-
2	4p-4b	Basil	+	+	-	-
3	4p-4c	Basil	+	+	-	-
4	4p-4d	Basil	+	+	-	-
16	4p-6a	Basil	+	+	-	-
17	4p-6c	Basil	+	+	-	-
18	4p-3a	Basil	+	+	-	-
19	4p-3b	Basil	+	+	-	-
20	4p-3c	Basil	+	+	-	-
21	4p-3d	Basil	+	+	-	-
28	4p-6b	Basil	+	+	-	-
33	4p-4e-a	Basil	+	+	-	-
34	4p-4e-b	Basil	+	+	-	-
39	4p-6d	Basil	+	+	-	-
41	4p-5b	Basil	+	+	-	-

Laboratuvarda siyez unundan hazırlanan ekşi mayadan 2 bakteri suşu izole edilmiştir. Bunlar 52 ve 102 no.lu suşlardır. Bu bakterilerin aerobik/anaerobik üreme yeteneği, morfolojik özellikleri ve katalaz testi sonuçları Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4 Ekşi mayadan (Siyez unu) izole edilen bakterilerin morfolojisi, aerobik/anaerobik üreme yeteneği ve katalaz testi sonuçları

Suş No	İzolasyon Kodu	Hücre morfolojisi	Aerobik üreme	Anaerobik üreme	Katalaz Testi	
					%30'lük H ₂ O ₂	%3'lük H ₂ O ₂
52	9p-1	Basil	+	+	-	-
102	9p-1d-b	Basil	+	+	-	-

Laboratuvarda kızılitan unundan hazırlanan ekşi mayadan 1 tane (57 no.lu) bakteri izole edilmiştir. Bu bakterinin aerobik/anaerobik üreme yeteneği, morfolojik özellikleri ve katalaz testi sonuçları Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5 Ekşi mayadan (Kızılitan unu) izole edilen bakterinin morfolojisi, aerobik/anaerobik üreme yeteneği ve katalaz testi sonuçları

Suş No	İzolasyon Kodu	Hücre morfolojisi	Aerobik üreme	Anaerobik üreme	Katalaz Testi	
					%30'lük H ₂ O ₂	%3'lük H ₂ O ₂
57	8p-5	Basil	+	+	+	+

Kızılitan unundan 5 tane suş izole edilmiştir. Bunlar 11, 22, 23 24 ve 100 no.lu suşlardır. 100 no.lu suş katalaz pozitif bakteridir Bu bakterilerin aerobik/anaerobik üreme yeteneği, morfolojik özellikleri ve katalaz testi sonuçları Çizelge 4.6'te verilmiştir.

Çizelge 4.6 Kızılitan unundan izole edilen bakterilerin morfolojisi, aerobik/anaerobik üreme yeteneği ve katalaz testi sonuçları

Suş No	İzolasyon Kodu	Hücre morfolojisi	Aerobik üreme	Anaerobik üreme	Katalaz Testi	
					%30'lük H ₂ O ₂	%3'lük H ₂ O ₂
11	5p-1	Kok	+	+	-	-
22	5p-2a	Kok	+	+	-	-
23	5p-2b	Kok	+	+	-	-
24	5p-2c	Kok	+	+	-	-
100	k-2a-a	Koko-basil	+	+	+	+

Siyez unundan 16 tane suş izole edilmiştir. Bunlar 29, 43, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 82, 83, 84, 85, 106, 107, 108 ve 109 no.lu suşlardır. Bu bakterilerin aerobik/anaerobik üreme yeteneği, morfolojik özellikleri ve katalaz testi sonuçları Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7 Siyez unundan izole edilen bakterilerin morfolojisi, aerobik/anaerobik üreme yeteneği ve katalaz testi sonuçları

Suş No	İzolasyon Kodu	Hücre morfolojisi	Aerobik üreme	Anaerobik üreme	Katalaz Testi	
					%30’lük H ₂ O ₂	%3’lük H ₂ O ₂
29	8p-8b	Basil	+	+	-	-
43	8p-8	Koko-basil	+	+	-	-
62	8p-9c-a	Basil	+	+	-	-
64	8p-10a-a	Basil	+	+	-	-
65	8p-10a-b	Basil	+	+	-	-
66	8p-10a-c	Basil	+	+	-	-
67	8p-10a-e	Basil	+	+	-	-
68	8p-9c-f	Basil	+	+	-	-
82	8p-9c-b	Basil	+	+	-	-
83	8p-9c-c	Basil	+	+	-	-
84	8p-9c-e	Basil	+	+	-	-
85	8p-10a-d	Basil	+	+	-	-
106	8p-10e-a	Koko-basil	+	+	-	-
107	8p-10e-b	Koko-basil	+	+	-	-
108	8p-10e-c	Koko-basil	+	+	-	-
109	8p-10e-d	Koko-basil	+	+	-	-

Hamurdan 7 tane suş izole edilmiştir. Bunların 2 tanesi (26 ve 32 no.lu suşlar) katalaz testi negatif bakteri, 5 tanesi katalaz testi pozitif (63, 77, 78, 87 ve 99 no.lu suşlar) bakteridir. Bu bakterilerin aerobik/anaerobik üreme yeteneği, morfolojik özellikleri ve katalaz testi sonuçları Çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.8 Hamurdan izole edilen bakterilerin morfolojisi, aerobik/anaerobik üreme yeteneği ve katalaz testi sonuçları

Suş No	İzolasyon Kodu	Hücre morfolojisi	Aerobik üreme	Anaerobik üreme	Katalaz Testi	
					%30'lük H ₂ O ₂	%3'lük H ₂ O ₂
26	9p-5a	Kok	+	+	-	-
32	9p-5c	Koko-basil	+	+	-	-
63	10p-10b-c	Kok	+	+	+	+
77	10p-10a-a	Kok	+	+	+	+
78	10p-10a-c	Kok	+	+	+	+
87	10p-10a-b	Kok	+	+	+	+
99	10p-10b-a	Kok	+	+	+	+

Katalaz testi negatif olan 39 suşun hareketlilik testi ve spor oluşturma yeteneği belirlenmiştir.

İşleroğlu vd. (2008), Fguiri vd. (2016) ve Konappa vd. (2016) yaptıkları çalışmalarda LAB'ların hareketsiz bakteriler olduğunu belirtmişlerdir. Bu ayırt edici özellik izole edilen muhtemel LAB suşları için test edilmiştir. Sonuçları Çizelge 4.9'da sunulan tüm suşların hareketsiz bakteriler olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.9 Katalaz negatif 39 bakteri suşunun hareketlilik ve sporulasyon test sonuçları

Suş No	Örnek	İzolasyon Kodu	Hareketlilik	Sporulasyon
1	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-4a	-	-
2	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-4b	-	-
3	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-4c	-	-
4	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-4d	-	-
11	Kızıltan unu	5p-1	-	-
16	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-6a	-	-
17	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-6c	-	-

Çizelge 4.9 Katalaz negatif 39 bakteri suşunun hareketlilik ve sporulasyon test sonuçları (devam)

Suş No	Örnek	İzolasyon Kodu	Hareketlilik	Sporulasyon
18	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-3a	-	-
19	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-3b	-	-
20	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-3c	-	-
21	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-3d	-	-
22	Kızıltan unu	5p-2a	-	-
23	Kızıltan unu	5p-2b	-	-
24	Kızıltan unu	5p-2c	-	-
26	Hamur	9p-5a	-	-
28	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-6b	-	-
29	Siyez unu	8p-8b	-	-
32	Hamur	9p-5c	-	-
33	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-4e-a	-	-
34	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-4e-b	-	-
39	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-6d	-	-
41	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-5b	-	-
43	Siyez unu	8p-8	-	-
52	Ekşi maya (Siyez unu)	9p-1	-	-
62	Siyez unu	8p-9c-a	-	-
64	Siyez unu	8p-10a-a	-	-
65	Siyez unu	8p-10a-b	-	-
66	Siyez unu	8p-10a-c	-	-
67	Siyez unu	8p-10a-e	-	-
68	Siyez unu	8p-9c-f	-	-
82	Siyez unu	8p-9c-b	-	-
83	Siyez unu	8p-9c-c	-	-
84	Siyez unu	8p-9c-e	-	-
85	Siyez unu	8p-10a-d	-	-
102	Ekşi maya (Siyez unu)	9p-1d-b	-	-
106	Siyez unu	8p-10e-a	-	-
107	Siyez unu	8p-10e-b	-	-
108	Siyez unu	8p-10e-c	-	-
109	Siyez unu	8p-10e-d	-	-

LAB'ların gram pozitif (+), katalaz negatif (-), hareketsiz ve sporsuz bakteriler oldukları bilinmektedir (Dinçer ve Kıvanç, 2017; Wang vd., 2018). Bu temel özellikleri taşıyan suşların; Çizelge 4.8'de verilen 1, 2, 3, 4, 11, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 29, 32, 33, 34, 39, 41, 43, 52, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 82, 83, 84, 85, 102, 106, 107, 108 ve 109 no.lu suşlar olduğu belirlenmiştir ve muhtemel LAB olarak değerlendirilmiştir. Bu 39 suş ile gluten hidrolizi ve probiyotik aktivite belirleme çalışmalarına geçilmiştir.

4.4. GA-1 ve GA-2 besiyerinde LAB suşlarının gluten hidroliz yeteneklerinin onaylanması

Çalışmanın bu aşamasında un ve ekşi maya kökenli 39 LAB suşunun ve 4 adet peynir suşunun gluten hidroliz yeteneği iki farklı besiyeri kullanarak onaylanmıştır. Çalışma aerobik ve anaerobik koşullarda yapılmıştır. GA-1 besiyerinin özelliği içerisinde gluten dışında başka azot kaynaklarının bulunmasıdır. GA-2 içeriğinde ise azot kaynağı olarak yalnızca gluten bulunmaktadır. Burada GA-1 ve GA-2 besiyerlerindeki hidroliz karşılaştırılmıştır. Bulgular GA-2 besiyerindeki hidrolizin GA-1 besiyerindeki hidrolizden daha iyi olduğunu göstermiştir. Bunun sebebi ise ortamda birden fazla azot kaynağı varlığında bakteriler, öncelikle daha kolay kullanabileceği azot kaynaklarına yönelirken ortamda tek bir azot kaynağı olarak gluten bulunması durumunda gluteni kullanabilmesidir. GA-1 ve GA-2 besiyerlerindeki gluten hidrolizi Çizelge 4.10'da verilmiştir. Hidroliz zonları Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.10 39 LAB suşunun GA-1 ve GA-2 besiyerlerinde gluten hidrolizi

Suş no	Gluten hidrolizi			
	GA-1 besiyeri		GA-2 besiyeri	
	Aerobik	Anaerobik	Aerobik	Anaerobik
1	+	+	++	++
2	+	+	++	++
3	+	+	++	++
4	+	+	++	++
11	+	+	++	++
16	+	+	++	++
17	+	+	++	++
18	+	+	++	++
19	+	+	++	++
20	+	+	++	++
21	+	+	++	++
22	+	+	++	++

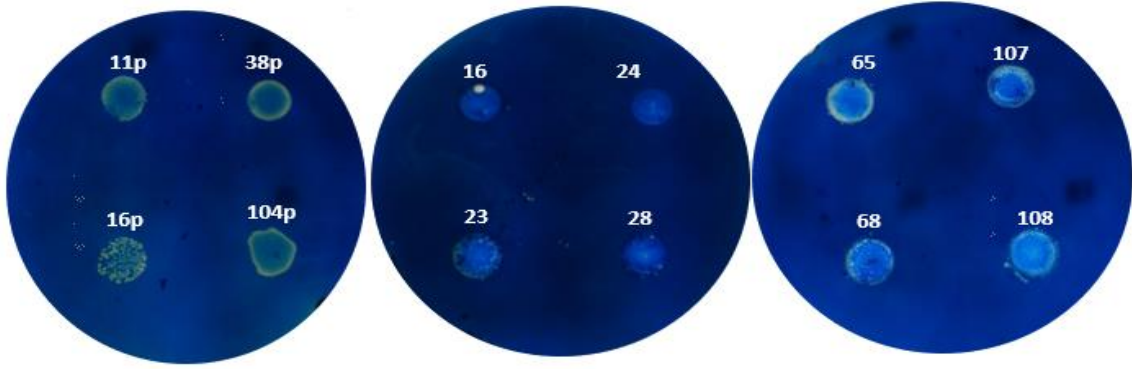
Çizelge 4.10 39 LAB suşunun GA-1 ve G-2 besiyerlerinde gluten hidrolizi (devam)

Suş no	Gluten hidrolizi			
	GA-1 besiyeri		GA-2 besiyeri	
	Aerobik	Anaerobik	Aerobik	Anaerobik
23	+	+	++	++
24	+	+	++	++
26	+	+	++	++
28	+	+	++	++
29	+	+	++	++
32	+	+	++	++
33	+	+	++	++
34	+	+	++	++
39	+	+	++	++
41	+	+	++	++
43	+	+	++	++
52	+	+	++	++
62	+	+	++	++
64	+	+	++	++
65	+	+	++	++
66	+	+	++	++
67	+	+	++	++
68	+	+	++	++
82	+	+	++	++
83	+	+	++	++
84	+	+	++	++
85	+	+	++	++
102	+	+	++	++
106	+	+	++	++
107	+	+	++	++
108	+	+	++	++
109	+	+	++	++

+ :İyi ++:Çok iyi

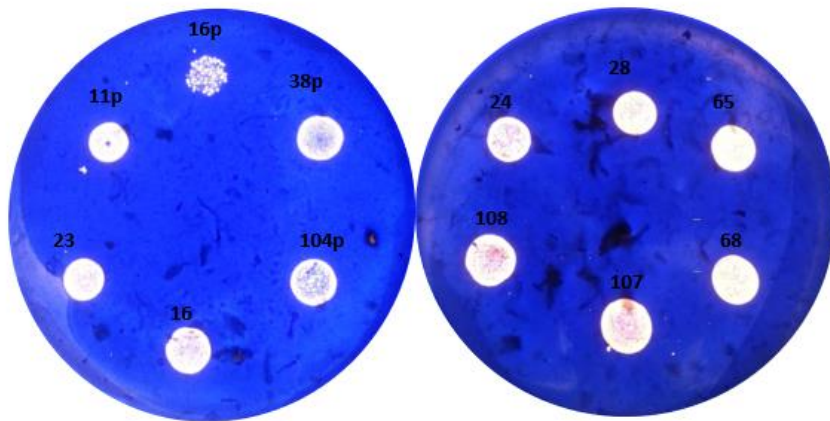
Sharma vd. (2018) yaptıkları çalışmada, glutene bağlı çölyak hastalığı ile başa çıkabilmek için probiyotik LAB'ları değerlendirmişlerdir. Toplam dört LAB suşu (*Lactobacillus paracasei* CD4, *L. gastricus* BTM7, *L. plantarum* K 90 ve *L. rhamnosus* GG) analiz edilmiştir. Gluten hidrolizi yeteneği, tüm LAB'ların petrisindeki koloniler etrafında açık bir bölge olarak belirtmişlerdir. Elde ettikleri bu sonuçlara göre, fermente gıdalardan izole edilen yerli probiyotiklerin buğday glutenini hidroliz etme potansiyelini ve ayrıca çölyak hastalığına bağlı immünojenik reaksiyonları önlemek için probiyotik bazlı gıdalar geliştirmek için kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır.

Bazı LAB suşlarının GA-1 besiyerinde oluşturdukları zonlar Şekil 4.1'de verilmiştir. Tek azot kaynağı olarak gluten bulunan GA-2 besiyerindeki hidroliz zonları ise Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 LAB suşlarının GA-1 besiyerinde oluşturdukları zonlar

Gerez vd. (2006) ekşi maya fermentasyonunda kullanılacak laktobasil ve pediokok suşlarının gluten bulunan bir ortamda büyümesi ve metabolik aktivitesini yaptıkları çalışma ile değerlendirmiştir. Toplam 42 LAB'tan yalnızca 13 LAB (9 laktobasil ve 4 pediokok) gluteni nitrojen kaynağı olarak kullanmıştır ve gluten bulunan ortamda büyüebilmiştir. *Pediococcus pentosaceus* CRL 797 suşunun, lactobacilli suşları ile benzer bir proteolitik aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Bu çalışmada, ekşi mayadan izole edilmiş pediokok suşlarının gluten üzerinde proteolitik aktiviteye sahip olduğu ilk kez kayıt edilmiştir. Ayrıca, tip III ekşi maya fermentasyonunda *P. pentosaceus* CRL 797 ve *L. plantarum* CRL 759 başlangıç kültürü olarak seçilebilir olduğu gösterilmiştir (Gerez vd., 2006).

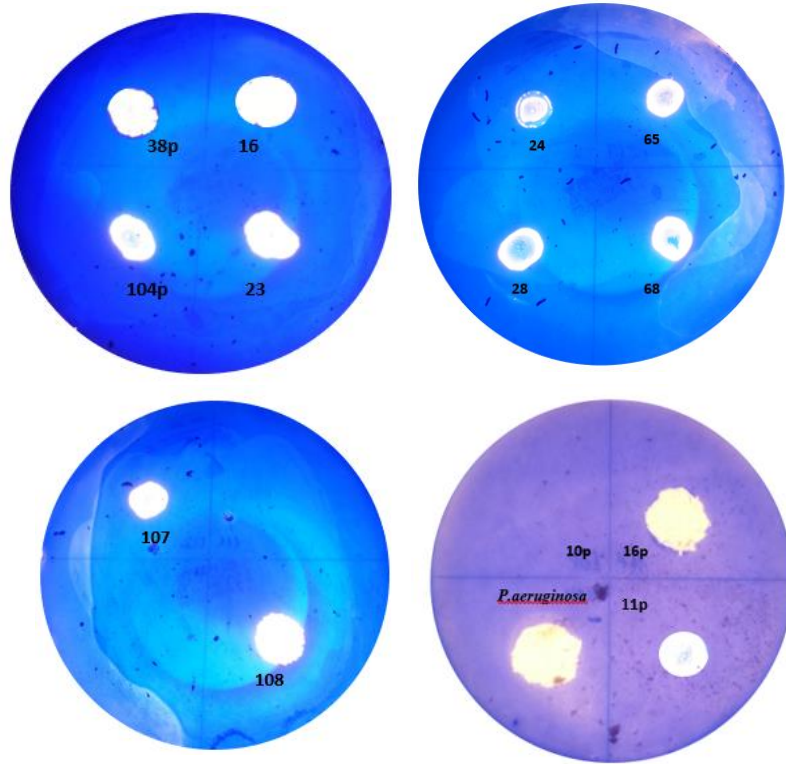


Şekil 4.2 LAB suşlarının GA-2 besiyerinde oluşturdukları zonlar

4.5. Seçilen suşlarla Gliadin hidrolizi testi

Gliadin, glutenin asıl immunojenik bileşenidir. Bu nedenle suşlar gliadin eklenmiş besiyerlerine ekilerek bunların saf gliadini hidrolize etme yetenekleri belirlenmiştir. Bu denemelerde bir önceki aşamada GA-1 ve GA-2 besiyerinde zon oluşturan LAB suşlarının gliadin hidrolizi belirlenmiştir. LAB suşlarının GGA besiyerinde oluşturdukları hidroliz zonları Şekil 4.3'te görülmektedir.

Gluteni sindiren bakterilerin insan dışkılarından ve tükürükten hızlı izolasyonu ile gliadin içeren petriler ile hidroliz belirleme çalışması yapılmıştır. İzole edilen bakterilerin ve geliştikleri ortamın süpernatantının gliadini sindirme kabiliyetine sahip olup olmadığını belirlemek için bir difüzyon gliadin agar plaka deneyi kullanıldı. *B. subtilis*, *B. pumilus*, *P. aeruginosa* ve bunların süpernatanı, gluteni sindirme yeteneği sergilemiştir. Ayrıca *S. salivarius* gliadin petrilerindeki berrak bölge, gluten hidroliz aktivitesini göstermiştir. Gliadini hidroliz etmek için *R. dentocariosa* aktivitesi difüzyon gliadin agar testi kullanılarak belirlenmiştir. *R. dentocariosa* etrafındaki açık bölge de glutenin hidroliz edildiğini göstermiştir (Berger vd., 2014).



Şekil 4.3 12 LAB suşunun GGA besiyerinde oluşturdukları zonlar (Pozitif kontrol: *P. aeruginosa*, negatif kontrol: 10p)

4.6. Gluten hidrolize eden 39 LAB suşunun probiyotik niteliklerinin belirlenmesi

4.6.1. Düşük pH'larda canlı kalma yetenekleri

Mikroorganizmaların gelişmesi için ortamın pH değeri önemli derecede etkilidir. Ortam asitliği arttıkça zararlı etkilerinin de artması starter kültür ve/veya probiyotik kültür olarak kullanılacak mikroorganizmaların aside dayanıklılıkları açısından önemlidir (Ertekin, 2007).

Sindirim sisteminde bulunan yararlı mikroorganizmaların en önemli özelliklerinden birisi bağırsak sistemindeki farklı koşullara karşı direnç gösterebilmeleridir. Bu farklı koşullar düşük pH'da, mide asitliğine dayanıklı olma ve safra tuzlarına karşı dirençli olmaktır (Alp ve Kuleaşan, 2019). LAB'ların asit toleranslı olduğunu bilinmektedir (Kazancıgil, 2018). Yapılan çalışmada pH1'de 28 ve 107 no.lu suşları zayıf da olsa canlı kalma yeteneği açısından öne çıkmaktadır. pH2'de öne çıkan suşlar; 52, 65 ve 107'dir. Bu ve diğer LAB suşlarının pH1 ve pH2 de canlı kalma yeteneklerinin sonuçları Çizelge 4.11'de verilmiştir. pH3 ve pH4'te ise canlı kalma yetenekleri açısından 21 suş (11, 22, 23, 24, 29,52, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 82, 83, 84, 85, 102, 106, 107, 108 ve 109 no.lu suşlar) daha dirençlidir. Çizelge 4.12'de ise suşların pH3 ve pH4 de canlı kalma yetenekleri verilmiştir. Mide asitliğinde canlı kalma yetenekleri inkübasyon sonunda petrielerde oluşan büyüme kolonilerinin var-yok olarak kayıt edilmesi ile belirlenmiştir. Klingberg vd. (2005) pH2.5'ta *L.plantarum* ve *L. pentosus*'un 1-4 saat arasında canlı kalabildiğini belirtmiştir.

Çizelge 4.11 İzolasyonda elde edilen 39 LAB suşunun pH1 ve pH2 de canlı kalma yetenekleri

Suş No	pH1												pH2												Kontrol	
	0. saat		1. saat		2. saat		3. saat		4. saat		8. saat		0. saat		1. saat		2. saat		3. saat		4. saat		8. saat		Suş	
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z
28	-	-	-	-	+	+	-	-	Z	Z	+	-	-	-	Z	-	Z	Z	Z	-	Z	Z	-	-	+	+
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z
39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z
52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	Z	Z	Z	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
64	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++

+++ : Çok iyi üreme, ++ : İyi üreme, z: Zayıf üreme, - : Üreme yok

Çizelge 4.11 İzolasyonda elde edilen 39 LAB suşunun pH1 ve pH2 de canlı kalma yetenekleri (devam)

Suş No	pH1												pH2												Kontrol		
	0. saat		1. saat		2. saat		3. saat		4. saat		8. saat		0. saat		1. saat		2. saat		3. saat		4. saat		8. saat		Suş		
65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	+++
66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
102	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
106	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z
107	-	-	++	+	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	+++	-	++	-	-	-	+++	-	+++	-	-	-	+++	+++
108	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
109	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z
Besiyeri Kontrol	-						-						-						-								

+++ : Çok iyi üreme, ++ : İyi üreme, z : Zayıf üreme, - : Üreme yok

Çizelge 4.12 İzolasyonda elde edilen 39 LAB suşunun pH3 ve pH4 de canlı kalma yetenekler

Suş No	pH3												pH4												Kontrol			
	0. saat		1. saat		2. saat		3. saat		4. saat		8. saat		0. saat		1. saat		2. saat		3. saat		4. saat		8. saat		Suş			
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z		
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	
11	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	Z	Z	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+++	+++	+++	++	++		
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	Z	Z	+	+	Z	Z	+	+	Z	Z		
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	
22	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+		
23	++	++	-	++	++	Z	-	-	-	-	-	-	++	-	++	++	++	++	+++	+++	++	Z	++	++	+	+		
24	++	-	-	++	Z	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++	++	++	++	+++	+++	++	++	+	+	+	+		
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	
28	+	+	-	++	+	+	++	++	++	++	++	++	-	-	+	+	+	+	++	++	++	++	+++	+++	+	+		
29	Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	-	-	-	-	-	++	-	Z	+++	-	+++	+	+		
32	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	++	-	-	-	-	Z	Z		
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	Z	Z	
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	
39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	-	-	Z	Z	-	Z	Z	Z	-	Z	-	Z	Z	Z	
52	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
62	+++	+++	+++	-	+++	-	+++	-	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+++ : Çok iyi üreme, ++ : İyi üreme, z: Zayıf üreme, - : Üreme yok

Çizelge 4.12 İzolasyonda elde edilen 39 LAB suşunun pH3 ve pH4 de canlı kalma yetenekler (devam)

Suş No	pH3												pH4												Kontrol		
	0. saat		1. saat		2. saat		3. saat		4. saat		8. saat		0. saat		1. saat		2. saat		3. saat		4. saat		8. saat		Suş		
64	+++	+++	+++	-	+++	-	+++	-	+++	++	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
65	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	-	+++	+++	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	
66	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	Z	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
67	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
68	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
82	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	Z	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	
83	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
84	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
85	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
102	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
106	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
107	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	-	-	-	-	Z	Z	+++	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	
108	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
109	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+++	
Besiyeri Kontrol	-						-						-						-								

+++ : Çok iyi üreme, ++ : İyi üreme, z : Zayıf üreme, - : Üreme yok

4.6.2. Safrada canlı kalma yetenekleri

Birçok LAB safra tuzuna dayanıklıdır ve bağırsak mukozasına tutunabilme kabiliyeti açısından diğer birçok mikroorganizma ile yarışarak sindirim sisteminde canlı kalabilmekte ve kolonize olabilmektedir (Gülgör ve Özçelik, 2014). Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların yüksek asitliğe ve safra tuzlarına dirençli olmaları gerekmektedir. Bu sayede mikroorganizmaların gastrointestinal sisteme geçişleri ve sistemde kalmaları sağlanmaktadır. Böylece mikroorganizmalar midedeki asit ortama karşı direnç gösterebilmekte ve ince bağırsakların başlangıcında safra tuzlarına dayanabilmektedir (Başyigit vd., 2007). Klingberg vd. (2005) yaptıkları çalışma ile probiyotik suşların seçiminde %0,3 safra tuzuna dayanıklılığın ayırt edici bir özellik olduğunu vurgulanmıştır.

Otuzdokuz LAB suşunun %0,3 ve %0,6 oranında safra bulunan bir ortamda safra tuzuna dayanıklılık sonuçları değerlendirildiğinde 18 suşun (22, 23, 52, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 82, 83, 84, 85, 102, 106, 107, 108 ve 109 no.lu suşlar) dayanıklılık açısından en iyi suşlar olduğu belirlenmiştir. Safrada canlı kalma yetenekleri inkübasyon sonunda petrilere oluşan büyüme kolonilerinin var-yok olarak kayıt edilmesi ile belirlenmiştir ve Çizelge 4.13'te verilmiştir.

Çizelge 4.13 İzolasyonda elde edilen 39 LAB suşunun %0,3 ve %0,6 oranında safra bulunan bir ortamda canlı kalma yetenekleri

Suş No	Safra %0,3												Safra %0,6												Kontrol			
	0. saat		1. saat		2. saat		3. saat		4. saat		8. saat		0. saat		1. saat		2. saat		3. saat		4. saat		8. saat		Suş			
1	Z	Z	+	+	Z	++	Z	Z	-	Z	-	Z	Z	-	+	+	Z	Z	-	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	
2	Z	Z	+	+	+	Z	Z	Z	-	-	+	Z	-	Z	+	Z	-	Z	Z	Z	Z	Z	+	Z	Z	Z	Z	
3	-	-	Z	Z	Z	Z	Z	Z	-	-	-	Z	-	-	-	-	Z	-	-	-	-	Z	-	-	Z	Z		
4	+	Z	+	Z	+	Z	Z	Z	Z	-	Z	+	Z	Z	++	+	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	
11	+	+	++	++	+	++	Z	+	++	++	+	Z	++	++	++	Z	Z	Z	Z	+	+	+	+	+	++	++		
16	Z	Z	++	++	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	+	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	+	Z	Z	Z	
17	Z	Z	++	+	+	+	Z	Z	-	Z	+	Z	Z	Z	Z	Z	+	+	Z	+	Z	+	Z	Z	Z	Z	Z	
18	-	-	++	+	+	+	+	Z	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	Z	Z	+	+	++	++	Z	Z	Z	
19	Z	Z	+	Z	Z	-	+	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	+	+	Z	-	Z	+	++	Z	+	-	Z	Z	Z	
20	Z	Z	+	Z	+	-	+	+	+	-	Z	++	Z	Z	+	+	Z	-	+	Z	Z	Z	Z	Z	-	Z	Z	
21	Z	Z	+	Z	+	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	+	+	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	-	Z	Z	
22	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
23	+	+	++	++	++	++	++	Z	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	Z	Z	++	++	+++	+++	+	+	+	
24	+	-	++	++	++	++	++	Z	++	++	+++	+++	++	+	++	++	++	++	Z	Z	++	++	+++	+++	+	+	+	
26	Z	Z	+	Z	Z	-	Z	Z	+	-	Z	Z	Z	Z	+	+	+	-	+	+	-	-	++	Z	Z	Z	Z	
28	+	+	+	+	++	++	Z	Z	+	+	+++	+++	+	+	++	+	++	++	Z	Z	++	++	+++	+++	+	+	+	
29	+	Z	+	+	+	Z	+	Z	+	++	+	++	+	+	++	Z	++	++	+	+++	++	Z	Z	++	+	+	+	
32	+	-	++	++	+	+	Z	Z	Z	-	Z	Z	+	+	+	+	+	+	Z	Z	-	Z	Z	-	Z	Z	Z	
33	+	-	+	+	+	+	-	Z	Z	Z	-	Z	+	+	++	++	+	+	Z	Z	-	Z	-	Z	Z	Z	Z	
34	Z	Z	+	Z	Z	Z	Z	+	Z	-	-	-	Z	Z	+	+	-	+	+	Z	-	Z	Z	Z	Z	Z	Z	
39	+	-	+++	+++	+	+	-	++	-	Z	Z	Z	+	+	++	+	+	+	Z	Z	-	Z	Z	Z	Z	Z	Z	

+++ : Çok iyi üreme, ++ : İyi üreme, z: Zayıf üreme, - : Üreme yok

Çizelge 4.13 İzolasyonda elde edilen 39 LAB suşunun %0,3 ve %0,6 oranında safra bulunan bir ortamda canlı kalma yetenekleri (devam)

Suş No	Safra %0,3												Safra %0,6												Kontrol		
	0. saat		1. saat		2. saat		3. saat		4. saat		8. saat		0. saat		1. saat		2. saat		3. saat		4. saat		8. saat		Suş		
41	Z	Z	+	Z	+	+	Z	Z	+	-	Z	Z	Z	Z	++	+	+	Z	+	Z	-	Z	Z	-	Z	Z	Z
43	-	-	-	-	-	-	Z	Z	-	Z	-	Z	Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	Z
52	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
62	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
64	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
65	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
66	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
67	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
68	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
82	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
83	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
84	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
85	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
102	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
106	Z	Z	Z	Z	+	Z	Z	Z	Z	-	-	+++	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	-	-	-	-	Z	Z
107	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	E	+++	+++
108	+	Z	+	+	+	+++	+++	+++	+	+	+	+++	+++	Z	+++	+++	+	+++	+	+	+++	+++	+	+	+++	+++	
109	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	-	Z	Z	Z	+++	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z
Besiyeri Kontrol	-						-						-						-								

+++ : Çok iyi üreme, ++ : İyi üreme, z: Zayıf üreme, - : Üreme yok

4.6.3. Yapay mide sıvısında canlı kalma

Probiyotik özelliğe sahip LAB suşlarının mide asitliğe dayanıklı olması ve mideden geçerek bağırsak sisteminde canlılığını devam ettirebilmesi oldukça önemlidir (Gülgör ve Özçelik, 2014). Birçok mikroorganizmanın mide içinde ölümüne neden olan mide (gastrik) suyu pH'ı yaklaşık 2'dir ve 2.5 litre olarak her gün salgılanmaktadır. Bundan dolayı insanlardaki gastrik taşımaya dayanıklılık probiyotiklerin seçiminde önemli bir kriterdir. Probiyotiklerin mideden geçerken canlılıklarını koruyabilmeleri suşların çeşitlerine ve elde edilme yollarına bağlıdır (Vinderola ve Reinheimer, 2003). Bu bilgilerden yola çıkarak izole edilen LAB suşlarının yapay mide sıvısı pH2 ve yapay mide sıvısı pH3 ortamında canlı kalabilme yetenekleri belirlenmiştir.

Otuzdokuz LAB suşunun pH2 ve pH3'te dayanıklılık sonuçları değerlendirildiğinde pH2'de 62 ve 107 no.lu suş canlılığını devam ettirebilmiştir. pH3'te ise 16 suşun (22, 23, 24, 52, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 82, 83, 84, 85, 102 ve 107 no.lu suşlar) dayanıklılık açısından en iyi suşlar olduğu belirlenmiştir. Yapay mide sıvısında canlı kalma yetenekleri inkübasyon sonunda petrielerde oluşan büyüme kolonilerinin var-yok olarak kayıt edilmesi ile belirlenmiştir ve Çizelge 4.14' te verilmiştir.

Vindorela ve Reinheimer (2003) çalışmalarında mide suyunda en yüksek canlı kalma oranının pH3'te *L.acidophilus* 'da (0,9-3,3 log cfu/g) olduğunu , pH2'de ise suşların çoğunda (*L.casei*, *L.rhamnosus*, *L.lactis*, *L.delbrueckii subsp. bulgaricus*) düşüşün >6 olduğunu belirtmiştir.

Çizelge 4.14 İzolasyonda elde edilen 39 LAB suşunun yapay mide sıvısı pH2 ve mide sıvısı pH3 ortamında canlı kalabilme yetenekleri

Suş No	Mide pH2												Mide pH3												Kontrol			
	0. saat		1. saat		2. saat		3. saat		4. saat		8. saat		0. saat		1. saat		2. saat		3. saat		4. saat		8. saat		Suş			
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z		
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	
11	Z	Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	+	+	+	+	++	+	+++	+++	Z	Z	+++	++	++		
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	
23	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++	+	+	++	++	+	+	+	+		
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	Z	++	++	++	++	+	+	++	++	+	+	+	+		
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	
28	+	+	-	Z	-	-	-	-	Z	Z	-	-	+	+	+	+	++	++	+	+	++	++	++	++	+	+		
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-	++	+	Z	Z		
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	Z	Z	
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	
39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	Z	Z	
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	
52	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	
62	+++	+++	+++	+	+++	++	+++	-	+++	-	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
64	+++	+++	-	-	-	-	-	-	Z	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
65	+++	+++	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+++ : Çok iyi üreme, ++ : İyi üreme, z: Zayıf üreme, - : Üreme yok

Çizelge 4.14 İzolasyonda elde edilen 39 LAB suşunun yapay mide sıvısı pH2 ve mide sıvısı pH3 ortamında canlı kalabilme yetenekleri (devam)

Suş No	Mide pH2												Mide pH3												Kontrol		
	0. saat		1. saat		2. saat		3. saat		4. saat		8. saat		0. saat		1. saat		2. saat		3. saat		4. saat		8. saat		Suş		
66	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
67	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
82	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++
83	+	Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++
84	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++
85	Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++
102	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
106	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	Z	+++	Z	Z	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z
107	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
108	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	+	+++	+++	+	Z	+	+	Z	Z	+	+	+++	+++	
109	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	-	-	Z	Z	Z	Z	Z
Besiyeri Kontrol	-						-						-														

+++ : Çok iyi üreme, ++ : İyi üreme, z : Zayıf üreme, - : Üreme yok

4.6.4 Otoagregasyon yetenekleri

Otoagregasyon kendiliğinden bir araya gelme, kümelenme olarak tanımlanmaktadır (Strompfova vd., 2004; Fortina vd., 2008). Probiyotik olarak kullanılacak bakterilerin otoagregasyon kabiliyetlerinin belirlenmesi önemlidir, çünkü sindirim sistemindeki mikroorganizmaların koloni oluşturarak bir araya gelmesi ve patojen mikroorganizmaların bağırsak yüzeyine yerleşmesinin engellenmesi açısından önemli etkenlerden biri otoagregasyon özelliğidir (Tareb vd., 2013). Bu çalışmada 12 LAB suşunun otoagregasyon yeteneği belirlenmiş ve otoagregasyon yüzdeleri %11,90-%23,91 arasında değişmiştir (Çizelge 4.15). En yüksek otoagregasyon yeteneğine sahip suş 108 (%23,91) iken en düşük otoagregasyon yeteneğine sahip suş ise 11P (%11,90)'dir. Sonuçlar literatürdeki çalışmalar ile paralel sonuçlar vermiştir.

Çizelge 4.15 12 LAB suşunun otoagregasyon yetenekleri

Suş Kodları	Otoagregasyon (%)
11P	11,90
16P	16,63
38P	15,49
104P	17,38
16	15,60
23	15,35
24	13,88
28	19,00
65	11,93
68	15,84
107	16,03
108	23,91

Benzer çalışmalarda farklı otoagregasyon yetenekleri belirlenmiştir. Örneğin, Sharma vd.'nin (2019) yaptıkları çalışmada babroo olarak bilinen geleneksel olarak fermente edilmiş buğday unu hamurundan potansiyel probiyotik laktik asit bakterilerini izole etmişlerdir. Üç

farklı *Lactobacillus fermentum* suşu, iki *Lactobacillus plantarum* suşu ve iki *Pediococcus acidilactici* tanımlanmıştır. İzolatların farklı hücresel otoagregasyon aktiviteye (% 5,0-41,0) sahip oldukları belirtilmiştir.

Tuo vd.'nin (2013) 22 *Lactobacillus* suşu yaptığı çalışmada suşların otoagregasyon özelliği ile epitel yüzeylere adezyon (tutunma) özelliği arasında pozitif bir ilişki tespit edilmiştir. Bu sebepten dolayı, probiyotiklerin seçiminde otoagregasyon yeteneklerinin önemli bir seçim kriteri olduğu belirtilmiştir.

Çin'de geleneksel fermente ürünlerden izole edilmiş 18 LAB'ın otoagregasyon özelliği ile Caco-2 hücrelerine tutunma özelliğinin incelendiği bir çalışmada; 37°C'de 5 saat inkübasyon sonrasında otoagregasyon yeteneği %5,92 ile %23,32 arasında tespit edilmiştir (Li vd., 2015).

Diğer bir çalışmada Çin'deki fermente tahıl içerikli gıdalardan izole edilen amilolitik LAB'ların (ALAB) probiyotik potansiyelini ve amilaz özellikleri belirlenmiştir. İzole edilen LAB'ların referans suş olan *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103'ten daha yüksek otoagregasyon yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (Xu vd., 2020).

Topçu vd.'nin (2020), yaptıkları çalışmada pastırmadan izole edilen 80 LAB suşunun probiyotik özellikleri araştırılmıştır. Yapılan gerekli testler sonucunda en yüksek oto-agregasyon yeteneğine sahip suş *P. pentosaceus* K41 (%17,62) olarak belirtilmiştir.

Dlamini vd.'nin (2019) yaptıkları çalışmada, hücre yüzey hidrofobikliği ve bir araya gelme yeteneklerini belirleyerek dört LAB'ın (*Lactobacillus reuteri* ZJ625, *Lactobacillus reuteri* VB4, *Lactobacillus salivarius* ZJ614 ve *Streptococcus salivarius* NBRC13956) güvenlik ve kolonizasyon özelliklerini değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda otoagregasyon yeteneklerinin sırasıyla %60 ila %70 ve %45 ila %56 arasında değiştiği belirtilmiştir.

Padmavathi vd.'nin (2018) yaptıkları bu çalışmada temel amaçlarını, bakterileri potansiyel probiyotik karakterler ve enzim üretimi açısından taramak olarak belirtmiştir. Oto-agregasyon özellikleri değerlendirilen tüm suşlar arasında *Lactobacillus fermentum* ve

Lactobacillus sp G3_4_1TO2, en yüksek oto-agregasyon yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir.

4.6.5. Hidrofobisite kapasiteleri

Probiyotiklerin bağırsak mukozasına yapışarak patojenlerin kolonize olmasını azalttığı, immün sistemi düzenleyerek zarar görmüş mukozanın iyileşmesini arttırdığı için önemlidir (Ouweland vd., 2001; Fernández vd., 2003). Bağırsak yüzeyine tutunma kapasitelerini ölçmek için yapılan hidrofobisite kapasite ölçme çalışmasında 12 tane LAB suşunun hidrofobisite kapasitesi %51,00 ile %99,15 arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 4.16). En yüksek 24 (%99,15) iken en düşük hidrofobisite kapasitesine sahip suş ise 16P (%51,00)'dir. Hidrofobisite kapasite sonuçlarının literatürdeki çalışmalar ile karşılaştırıldığında paralel sonuçlar vermesinin yanında bazı suşların daha iyi hidrofobisite kapasitesine sahip olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.16 12 LAB suşunun hidrofobisite kapasitesi

Suş Kodları	Hidrofobisite (%)
11P	92,21
16P	51,00
38P	85,05
104P	86,78
16	94,18
23	97,68
24	99,15
28	87,17
65	98,12
68	97,20
107	98,95
108	98,45

Dlamini vd. (2019) yaptıkları çalışmada, hücre yüzey hidrofobikliği ve bir araya gelme yeteneklerini belirleyerek dört LAB'ın (*Lactobacillus reuteri* ZJ625, *Lactobacillus reuteri* VB4, *Lactobacillus salivarius* ZJ614 ve *Streptococcus salivarius* NBRC13956)

güvenlik ve kolonizasyon özelliklerini değerlendirilmiştir. Değerlendirmeleri sonucunda suşların yüksek hidrofobiklik gösterdiği (%78-84) belirtilmiştir.

Sharma vd. (2019), babroo olarak bilinen geleneksel olarak fermente edilmiş buğday unu hamurundan potansiyel probiyotik laktik asit bakterilerini izole etmişlerdir. Üç farklı *Lactobacillus fermentum* suşu, iki *Lactobacillus plantarum* suşu ve iki *Pediococcus acidilactici* tanımlanmıştır. İzolatların hücre yüzeyi hidrofobikliği bakımından farklı aktiviteye (%20,0-42,0) sahip olduklarını yaptıkları çalışma ile ortaya koymuştur.

Yapılan bir çalışmada hücre yüzeyi hidrofobisitesinin %11,5 ile %55,92 arasında değiştiği belirtilmiştir. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*'nin hidrofobisite yeteneğinin *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'a göre yüksek olduğu ifade edilmiştir. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* hidrofobisite yeteneği ; %25,89-%37,50 arasındadır. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*'nin ise %42,90-%58,75 arasında olduğu belirtilmiştir (Demirok ve Alpaslan, 2017).

Sakandar vd. (2018) fermente edilmiş ekşi hamurlardan (Khamir) gluten hidrolize edebilen mikroflorayı izole etmek ve karakterize etmek için bu çalışmayı yapmıştır. 16S ve 28S rRNA dizilimi ile *Enterococcus mundtii*, *Bacillus cereus* ve *Bacillus megaterium* suşları ile birlikte dört *Enterococcus faecalis* suşunun varlığını ortaya koymuşlardır. Tüm maya suşları *Wickerhamomyces anomalus* olarak tanımlandı. Tüm mikrobiyal suşlar arasında, *E. mundtii* QAUUSD01 ve *W. anomalus* QAUWA03, diğer gluten hidrolize eden mikroorganizmalar ile karşılaştırıldığında hidrofobisite özelliğinin olduğunu tespit edilmiştir.

Bir başka çalışmada pastırmadan izole edilen 80 LAB suşunun probiyotik özellikleri araştırılmıştır. Yapılan gerekli analizler sonucunda 6 suşun (*P. pentosaceus* K7, K41, K44, K51 ve K81 ve *P. acidilactici* K99) hidrofobiklik yeteneği açısından en yüksek değerlere sahip olduğu belirtilmiştir (Topçu vd., 2020).

Yine farklı bir çalışmada Tallapragada vd. (2018) tarafından, bakterilerin potansiyel probiyotik karakterleri ve enzim üretimi açısından taraması yapılmıştır. Probiyotik

özellikleri belirlenen tüm suşlar içerisinde yüzey hidrofobisite özellikleri en yüksek olan suşlar *Lactobacillus fermentum* ve *Lactobacillus* sp. G3_4_1TO2'dir.

4.6.6. LAB'ların antimikrobiyal aktivitesi

Gıda ürünlerinin bozulmasını engellemek ve güvenliklerini arttırmak için katkı maddelerine ihtiyaç duyulmaktadır. LAB'ların organik asitler (laktik, asetik, fenilaktik, 4-hidroksifenilaktik, benzoik asitler gibi), diasetil, asetaldehit, asetoin, H₂O₂, CO₂, etanol ve bakterisidal peptitler de dahil olmak üzere farklı antagonistik maddeler ürettiği bilinmektedir. Biyo-koruyucu ajanlar diye geçen LAB'lar, antimikrobiyal bileşikler üreten canlı birer kültür olarak kullanılabilir (Sjögren vd., 2003 ; Valerio vd., 2004; Salomskiene1 vd., 2019). Bazı LAB'lar tarafından üretilen “bakteriosin veya bakteriosin benzeri metabolitler” olarak adlandırılan antimikrobiyal karakterli proteinler, özellikle yakın ilişkili oldukları bakteriler üzerine inhibitör etki göstermektedir (Çon ve Gökalp, 2000).

Otuzdokuz LAB suşunun antimikrobiyal aktivitesi, 15 indikatör test mikroorganizmasına karşı denenmiş ancak sadece 6 LAB suşunun *P. aeruginosa*'ya karşı antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.17). *P. aeruginosa*'ya karşı antimikrobiyal etkisi 22,55±2,1 mm inhibisyon zon çapı en yüksek 2 no.lu suş iken en düşük inhibisyon çapına sahip suş 15,91±0,2 mm ile 23'tür. Diğer LAB suşlarından (33 LAB) hiçbiri test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkili olmamıştır.

Çizelge 4.17 6 tane LAB suşunun antimikrobiyal aktivitesi

LAB suşlarının İnhibisyon Zon Çapı (mm)						
Suş no:	2	3	23	24	26	29
<i>P. aeruginosa</i>	22,55±2,1	22,33±0,3	15,91±0,2	16,52±0,3	21,70±1,2	20,36±1,2

Lactobacillus coryniformis tarafından üretilen bir antifungal peptidin, sınırlı bir pH aralığında aktif olduğu ve etanol aktivitesini arttırdığı belirtilmiştir (Salomskiene1 vd., 2019).

Gösterdikleri antimikrobiyal aktivitede 10,0 ile 17,2 mm arasında değişen inhibisyon zonlarının gözlemlendiği belirtilmiştir. $17,2 \pm 0,21$ ve $17,1 \pm 0,21$ mm'lik en büyük üreme inhibisyon zonları *C. jejuni* ATCC 33291'e karşı *L. rhamnosus* W71 ve *L. casei* W56'nın süpernatantı ile elde ulaşılmıştır (Campana vd., 2017).

Bartkiene vd. (2020) tarafından geleneksel protokollerle uygun olarak üretilen ekşi mayadan LAB izolasyonu yapılarak antimikrobiyal karakterizasyonu belirlenmiştir. On üç LAB suşu izole edilmiştir. *L. plantarum* No. 122, *L. casei* No. 210, *Lactobacillus curvatus* No. 51, *L. paracasei* No. 244 ve *L. coryniformins* No. 71, test edilen on beş patojenik suşun tümüne karşı büyüme inhibisyon özellikleri gösterdiği belirtilmiştir.

Manini vd. (2016), buğday kepeği ekşi hamurundan izole edilen laktik asit bakterilerinin karakterizasyonuna yönelik çalışmalar gerçekleştirmiştir. Karakterizasyonu yapılan LAB'lardan; *L. plantarum* CE42, CE60, CE84 ve *P. pentosaceus* CE65, test edilen *Listeria* türlerine (*L. innocua*, *L. monocytogenes*, *L. welshimeri*) karşı yüksek aktivite göstermiştir. *Leuconostoc citreum* CE88, CE54 sadece *L. monocytogenes*'i inhibe edebilmiştir ve *L. sakei* CE47, *L. monocytogenes* ve *L. welshimeri*'ye karşı aktivitesinin olduğu belirtilmiştir.

Kuzeybatı Arjantin'de nohut mayasından izole edilen LAB'ların tanımlanması ve biyoteknolojik karakterizasyonu çalışmasında izole edilen ve tür tanımlaması yapılan suşlar arasındaki *E. durans* CRL 2193 no.lu suşun *Bacillus cereus* MBC2'ye karşı antimikrobiyal etkisi olduğu belirtilmiştir (Sáez vd., 2018).

4.6.7. LAB'ların proteolitik özelliklerinin belirlenmesi

Skim milk hidrolizi

Proteolitik aktivite yetenekleri belirlenen 39 LAB suşunun sonuçları Çizelge 4.18'de verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında süt tozu olarak bilinen skim milk hidrolizini hiçbir suş gerçekleştirmemiştir. Negatif sonuçlar – ile ifade edilmiştir.

Kazein hidrolizi

LAB'lar, gelişimleri için ortamdaki bazı serbest amino asitlerin bulunmasına ihtiyaç duyarlar. *Streptococcus* türleri, hücre dışı proteinaz enzimiyle özellikle hücre zarına bitişik olan kazeini peptitlerine parçalamaktadır. Bu peptitler, bakteri hücresi tarafından alınır ve hücre içi olarak hidrolize edilmektedir (Yüksekdağ ve Beyatlı, 2003). Otuzdokuz LAB suşunun, pozitif kontrol olan *P. aeruginosa* ve negatif kontrol suşu olan *E. coli*'nin kazein hidrolizi sonuçları Çizelge 4.18'de verilmiştir. Sonuçlar petrillerdeki hidroliz zonlarına göre değerlendirilmiştir ve LAB suşlarının hidroliz zonu oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Pozitif Negatif sonuçlar – ile ifade edilmiştir.

Jelatin hidrolizi

LAB'ların jelatinaz aktivitesine sahip olup olmadığının test edildiği bu çalışmada 39 LAB suşu içerisinde 41 ve 83 no.lu suşlar dışındaki 37 suşun jelatinaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Çalışma için pozitif kontrol olan *S. aureus* suşunun jelatin hidrolizi test sonuçları da dahil olmak üzere LAB suşlarının sonuçları Çizelge 4.18'de verilmiştir. Hidroliz gözlemlenen tüpler için pozitif sonuçlar + ile hidroliz gözlemlenmeyen tüpler için negatif sonuçlar – ile ifade edilmiştir.

Yöresel peynirlerden antimikrobiyal aktivitesi olan LAB'ların izolasyonu ve tanımlanması çalışması için izole edilen bakterilerin jelatinaz aktivitesi göstermediği tespit edilmiştir (İşleroğlu vd., 2008).

4.6.8. Glukozdan gaz üretimi

Glukozdan gaz üretimi bir karbonhidrat fermentasyonu olup pirüvatın çeşitli bileşiklere dönüşmesiyle son ürünler açığa çıkmaktadır. Glukoz fermentasyonu ile sadece laktik asit üreten mikroorganizmalar homofermentatif; asetik asit, alkol, formik asit, CO₂ gibi birden çok ürüne fermente edebilen mikroorganizmalara ise heterofermentatif denmektedir (Abdel-Rahmen vd., 2013). Glukozdan CO₂ üretimi test edilecek 39 LAB suşunun, glukozdan gaz üretimi sonuçları Çizelge 4.18'de verilmiştir.

Glukozdan CO₂ ürettiği gözlemlenen 6 suşun (3, 66, 82, 102 ve 107 no.lu) sonuçları pozitif olarak değerlendirilmiştir ve + ile gösterilmiştir. Glukozdan CO₂ üretmeyen 33 suşun sonuçları ise negatif olarak değerlendirilmiştir ve - ile ifade edilmiştir.

Fugelsang vd. (2007) yaptıkları çalışmada şaraptan elde ettikleri bazı *Lactobacillus* türlerinin karakteristik özelliklerine bakıldığı glukozdan gaz üretimi olan *L. brevis*, *L. hilgardii* ve *L. kunkeei* iken glukozdan üretmeyen türü *L. plantarum* olarak belirtmişlerdir.

Leuconostoc cinsine ait bakteriler heterofermantatif bakterilerdir glukozdan gaz üretimi gerçekleştirerek gıdanın yapısında değişikliklere sebep olurlar. Glukozdan sadece D-laktik asit üretebilmektedir. Ayrıca arginini amonyağa dönüştüremedikleri bildirilmiştir (König vd., 2009).

Çizelge 4.18 İzole edilen 39 LAB suşunun skim milk hidrolizi, kazein hidrolizi, jelatin hidrolizi ve glukozdan gaz üretebilme özellikleri

Suş No	Örnek	İzolasyon Kodu	Skim milk Hidrolizi			Kazein Hidrolizi			Jelatin Hidrolizi			Glukozdan gaz üretimi		
			a*	b*	c*	a*	b*	c*	a*	b*	c*	a*	b*	c*
1	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-4a	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
2	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-4b	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
3	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-4c	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
4	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-4d	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
11	Kızıltan unu	5p-1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
16	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-6a	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
17	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-6c	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
18	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-3a	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
19	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-3b	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-

a* : 1.paralel, b* : 2.paralel, c* :3.paralel, y: Yapılmadı

Çizelge 4.18 İzole edilen 39 LAB suşunun skim milk hidrolizi, kazein hidrolizi, jelatin hidrolizi ve glukozdan gaz üretebilme özellikleri (devam)

Suş No	Örnek	İzolasyon Kodu	Skim milk Hidrolizi			Kazein Hidrolizi			Jelatin Hidrolizi			Glukozdan gaz üretimi		
			a*	b*	c*	a*	b*	c*	a*	b*	c*	a*	b*	c*
20	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-3c	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
21	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-3d	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
22	Kızıltan unu	5p-2a	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
23	Kızıltan unu	5p-2b	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
24	Kızıltan unu	5p-2c	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
26	Hamur	9p-5a	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
28	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-6b	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
29	Siyez unu	8p-8b	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
32	Hamur	9p-5c	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
33	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-4e-a	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
34	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-4e-b	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
39	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-6d	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
41	Ekşi maya (Fethiye-Muğla)	4p-5b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	Siyez unu	8p-8	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
52	Ekşi maya (Siyez unu)	9p-1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
62	Siyez unu	8p-9c-a	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
64	Siyez unu	8p-10a-a	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
65	Siyez unu	8p-10a-b	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
66	Siyez unu	8p-10a-c	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
67	Siyez unu	8p-10a-e	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
68	Siyez unu	8p-9c-f	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
82	Siyez unu	8p-9c-b	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
83	Siyez unu	8p-9c-c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
84	Siyez unu	8p-9c-e	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-

a* : 1.paralel , b* : 2.paralel , c* :3.paralel , y: Yapılmadı

Çizelge 4.18 İzole edilen 39 LAB suşunun skim milk hidrolizi, kazein hidrolizi, jelatin hidrolizi ve glukozdan gaz üretebilme özellikleri (devam)

Suş No	Örnek	İzolasyon Kodu	Skim milk Hidrolizi			Kazein Hidrolizi			Jelatin Hidrolizi			Glukozdan gaz üretimi		
			a*	b*	c*	a*	a*	b*	c*	a*	a*	b*	c*	a*
85	Siyez unu	8p-10a-d	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
102	Ekşi maya (Siyez unu)	9p-1d-b	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
106	Siyez unu	8p-10e-a	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
107	Siyez unu	8p-10e-b	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
108	Siyez unu	8p-10e-c	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
109	Siyez unu	8p-10e-d	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Kontrol grupları		<i>P. aeruginosa</i>	y	y	y	+	+	+	y	y	y	y	y	y
		<i>E. coli</i>	y	y	y	-	-	-	y	y	y	y	y	y
		<i>S. aureus</i>	y	y	y	y	y	y	+	+	+	y	y	y

a* : 1.paralel, b* : 2.paralel, c* :3.paralel, y: Yapılmadı

4.7. Gluten hidrolizi için optimum koşulların belirlenmesi

4.7.1. Aerobik ve anaerobik koşullarda gluten hidrolizi

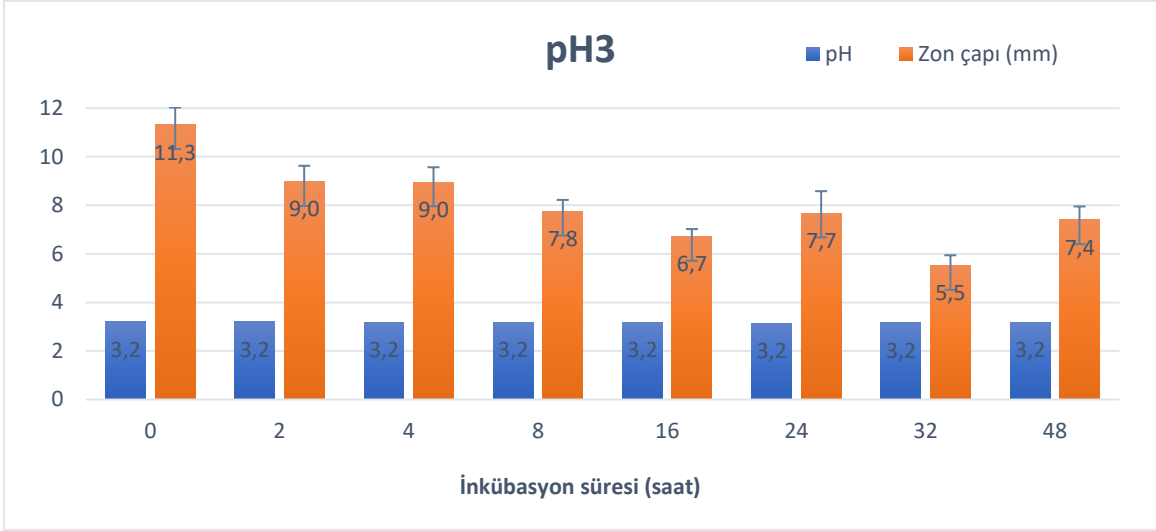
İzole edilen 39 LAB suşundan farklı kaynak ve farklı morfoloji olan 12 LAB suşu seçilerek aerobik ve anaerobik ortamda inkübasyon sonucu petrideki zon çapları ölçülerek mm cinsinden Çizelge 4.19'da verilmiştir. Suşların çoğunluğu, anaerobik koşullara oranla, aerobik koşulda daha geniş proteoliz zon çapları oluşturmuştur. Aerobik koşullarda en iyi hidroliz zon çapına sahip suş 68 iken ($9,4 \pm 0,4$), anaerobik koşullarda en iyi hidroliz zon çapına sahip suş 24 no.lu suştur. Peynirden izole edilen 38P kodlu suşun ise anaerobik ortamdaki zon çapı $0,8 \pm 1,4$ mm sonuç verirken aerobik ortamda zon çapı $7,1 \pm 1,4$ mm'dir.

Çizelge 4.19 Aerobik ve anaerobik koşullarda gluten hidrolizi.

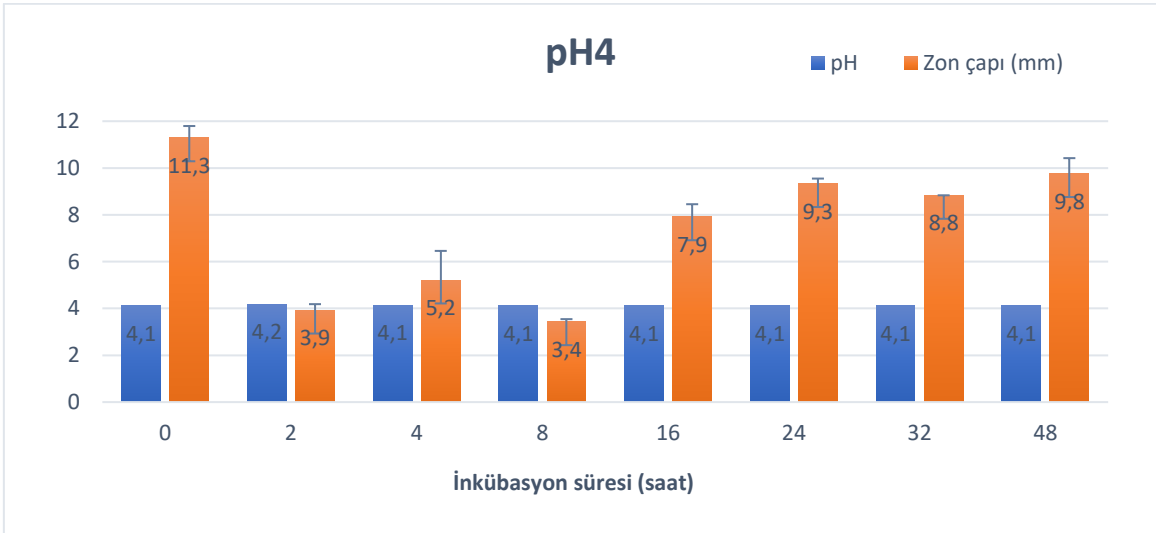
Suş No	Hidroliz zon çapları (mm)	
	Aerobik	Anaerobik
11P	8,4±0,2	4,7±1,7
16P	6,5±0,8	5,2±1,1
38P	7,1±1,4	0,8±1,4
104P	8,3±1,0	5,9±2,3
16	8,8±0,4	7,8±0,6
23	8,5±0,2	7,3±0,5
24	8,6±0,7	9,1±0,7
28	6,9±0,7	8,7±0,3
65	8,5±0,5	6,3±0,5
68	9,4±0,4	8,9±0,5
107	8,6±0,7	7,7±3,2
108	8,6±1,0	7,8±0,5

4.7.2. Gluten besiyerinde farklı pH ortamında üreme yetenekleri

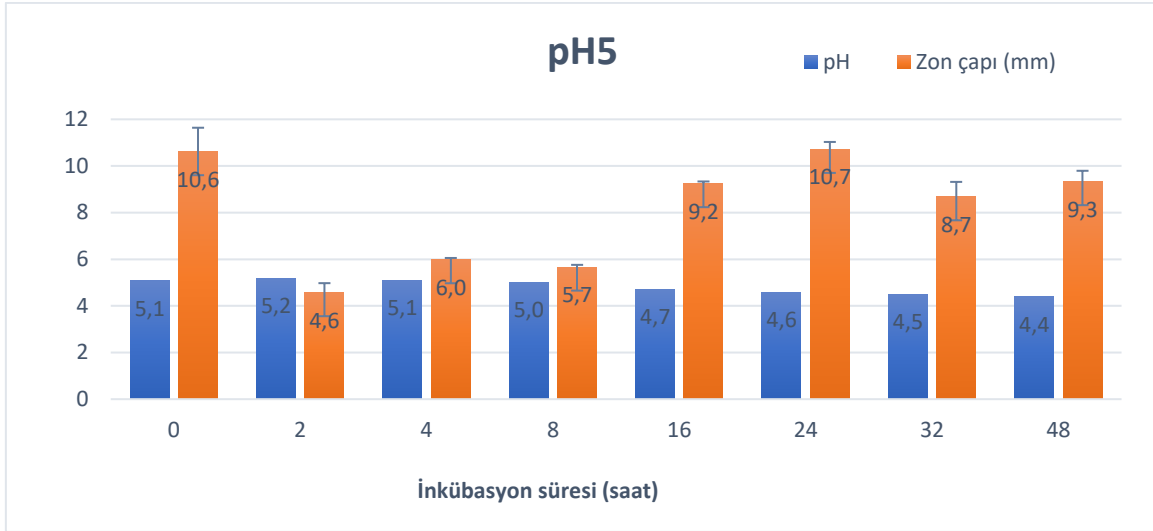
Belirlenen 12 LAB suşu arasından kızılıtan unundan izole edilen 23 ve 24 no.lu suşlar, siyez unundan izole edilen 68 ve 107 no.lu suşlar seçilerek toplam 4 LAB suşunun GB-2 besiyerinde altı farklı pH (pH3, pH4, pH5, pH6, pH7 ve pH8) ile sekiz ayrı zaman diliminde örnek alınarak yapılan gluten hidrolizi çalışmasında 48 saatlik inkübasyon süresince 10 µl örnekler alınmıştır ve GA-2 besiyeri petrilere ekim yapılarak 24 saat inkübe edilmiştir. Çalışmamızın pH değişimleri ve farklı pH değerlerindeki GA-2 besiyerinde 24 saat inkübe edilen 23, 24, 68 ve 107 no.lu LAB suşlarının meydana getirdikleri hidroliz zonlarının çapları ise Şekil 4.4-4.27’de gösterildiği gibidir.



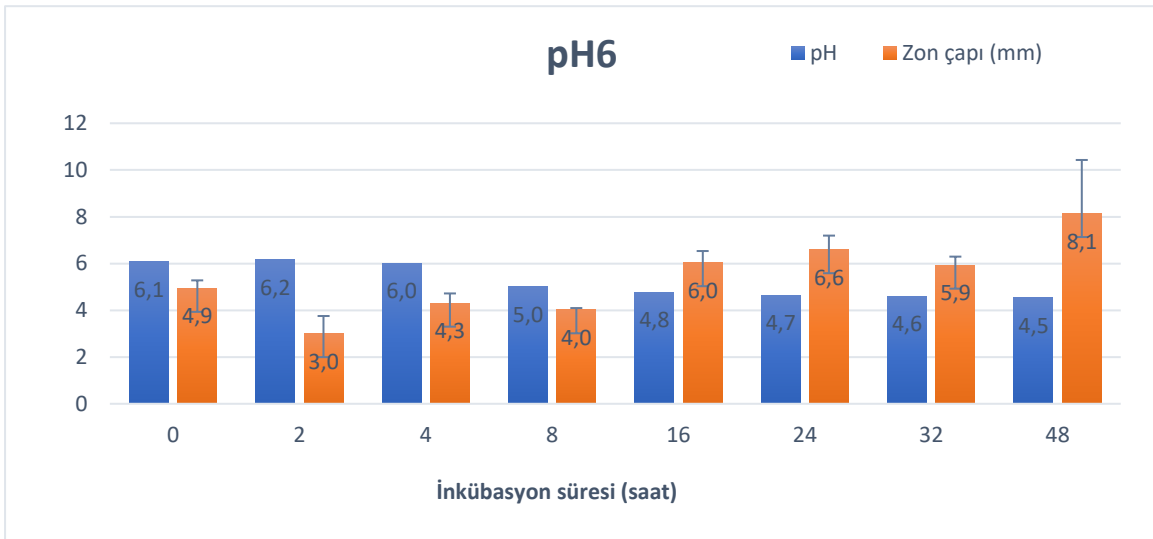
Şekil 4.4 23 no.lu LAB suşunun pH3'teki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği



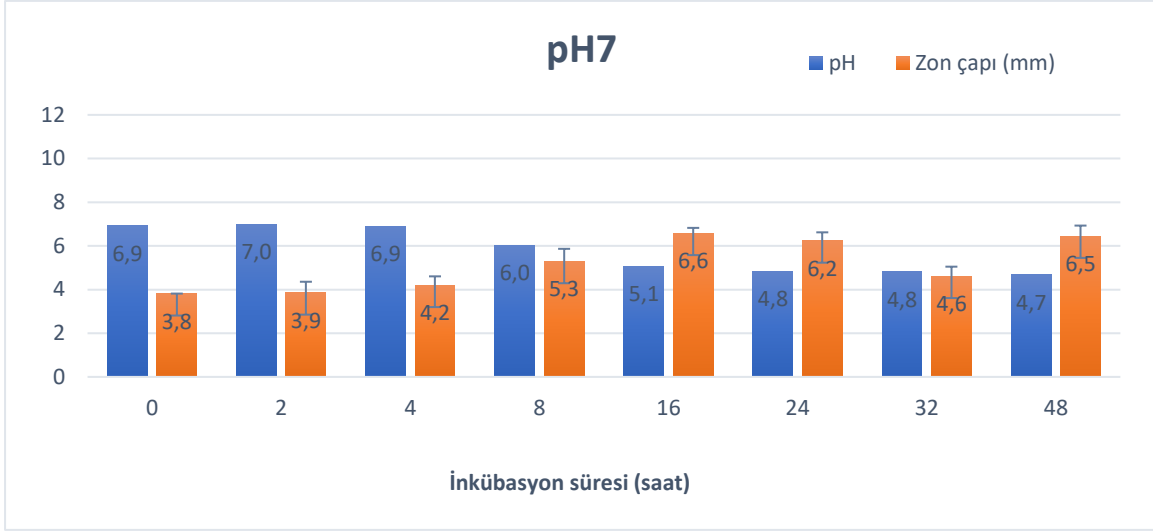
Şekil 4.5 23 no.lu LAB suşunun pH4'teki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği



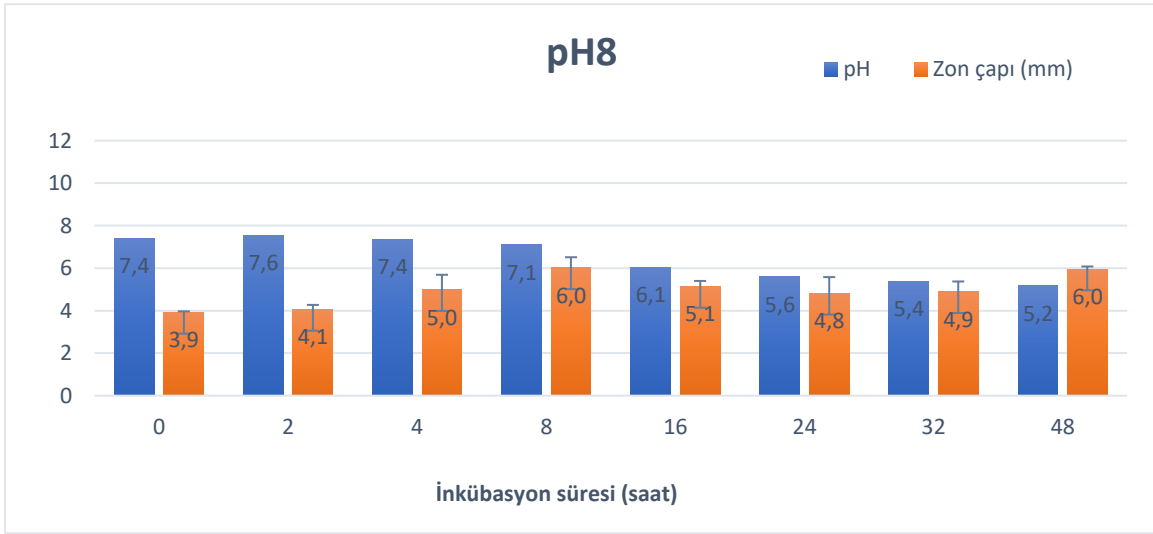
Şekil 4.6 23 no.lu LAB suşunun pH5'teki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği



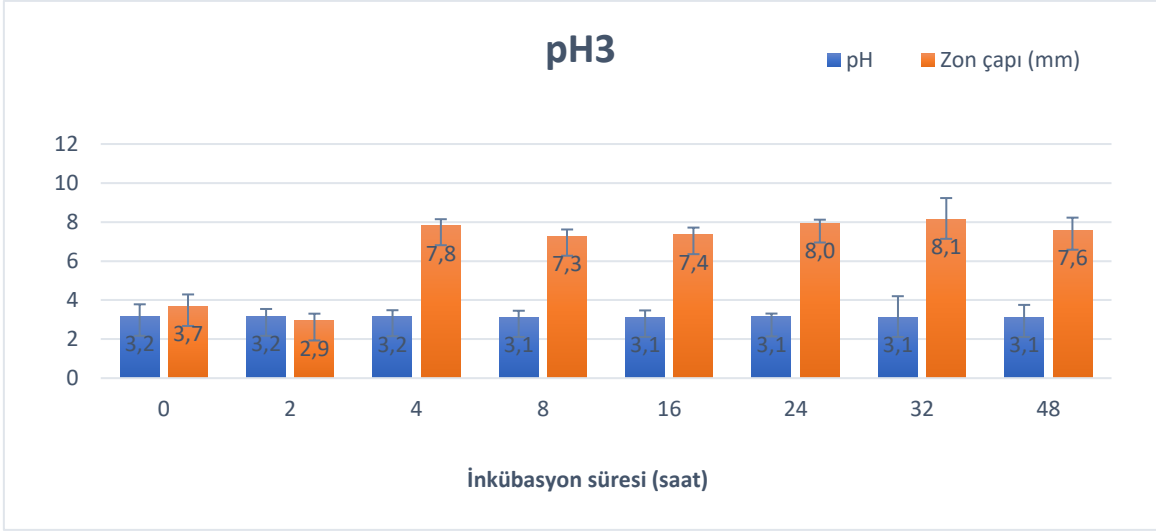
Şekil 4.7 23 no.lu LAB suşunun pH6'daki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği



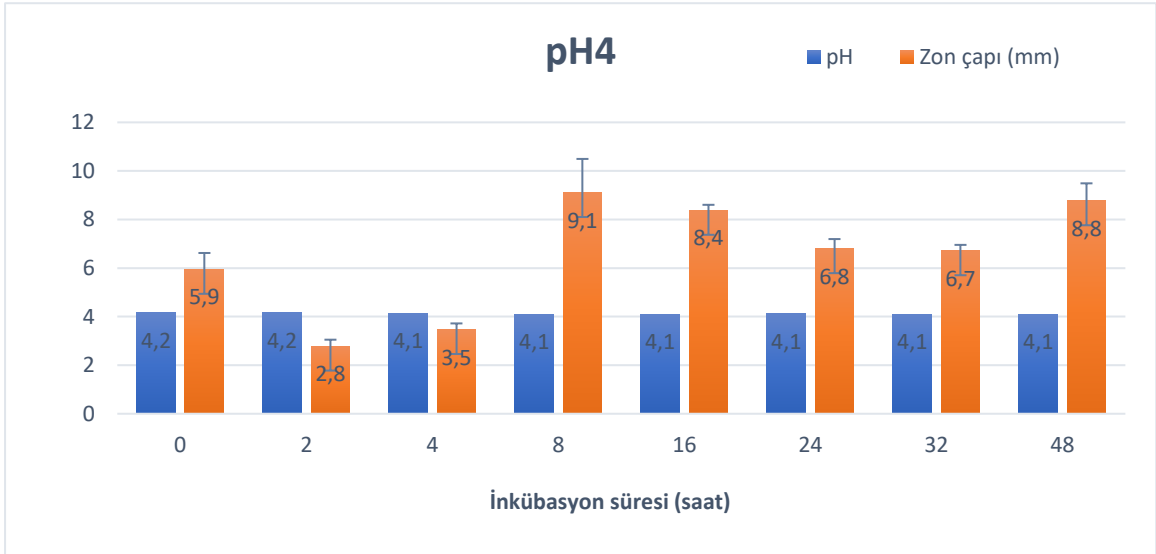
Şekil 4.8 23 no.lu LAB suşunun pH7'deki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği



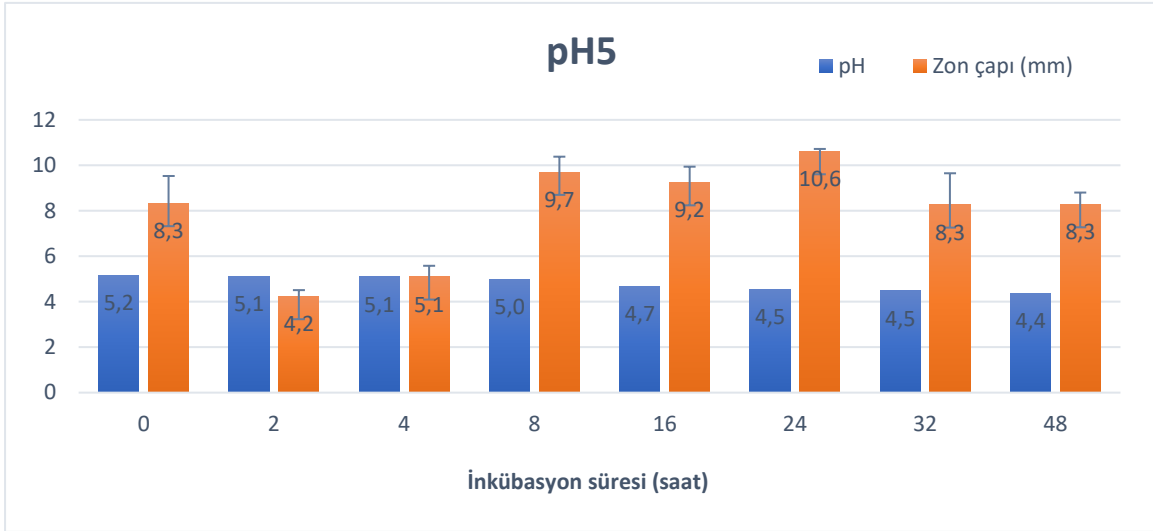
Şekil 4.9 23 no.lu LAB suşunun pH8'deki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği



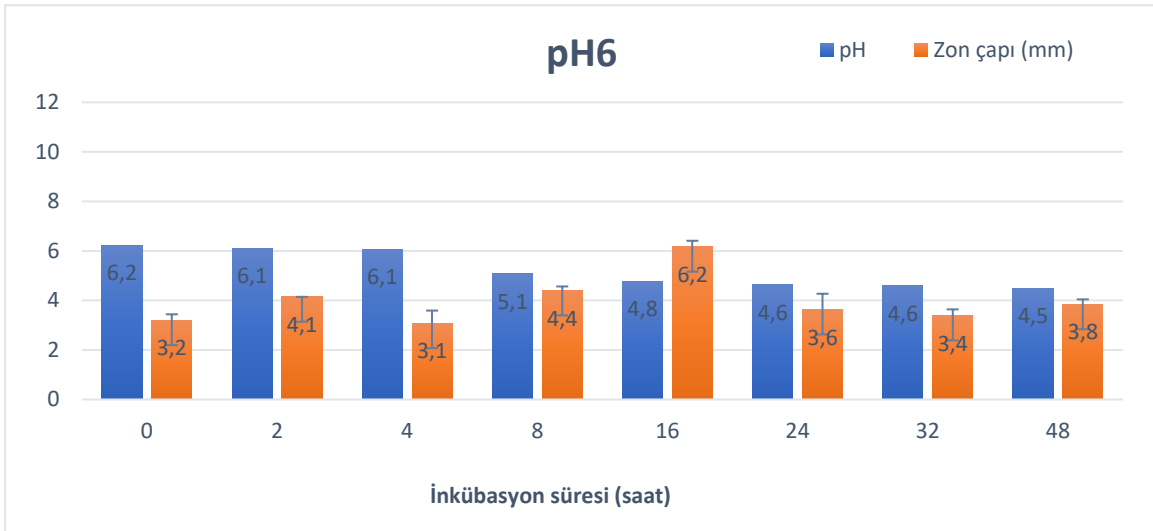
Şekil 4.10 24 no.lu LAB suşunun pH3'teki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği



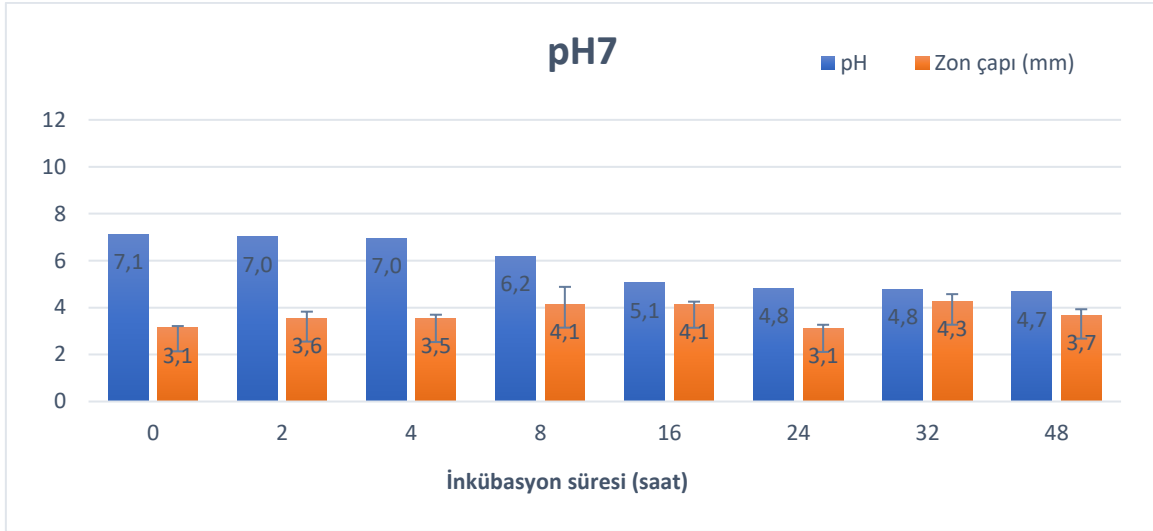
Şekil 4.11 24 no.lu LAB suşunun pH4'deki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği



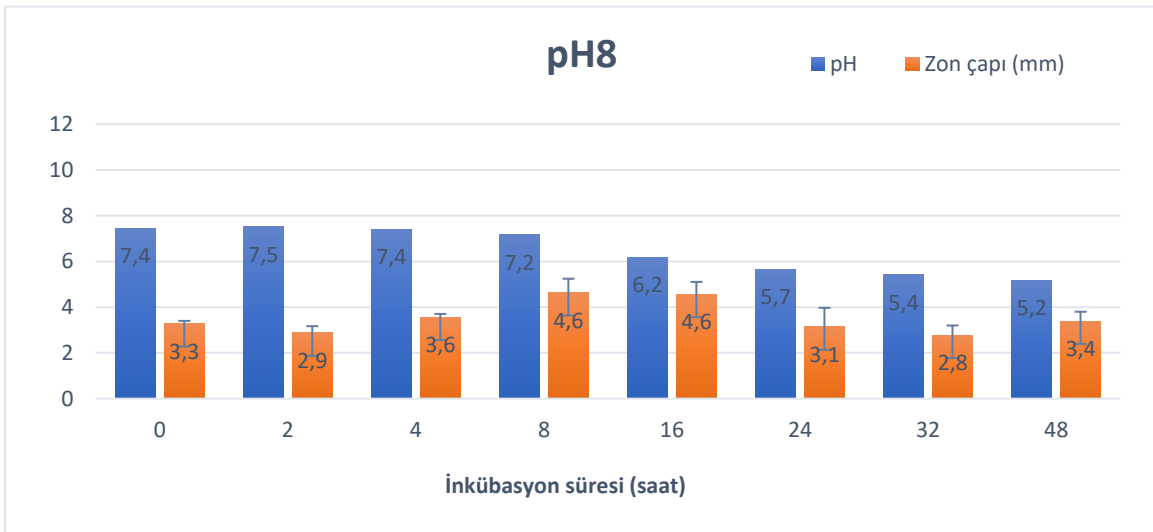
Şekil 4.12 24 no.lu LAB suşunun pH5'teki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği



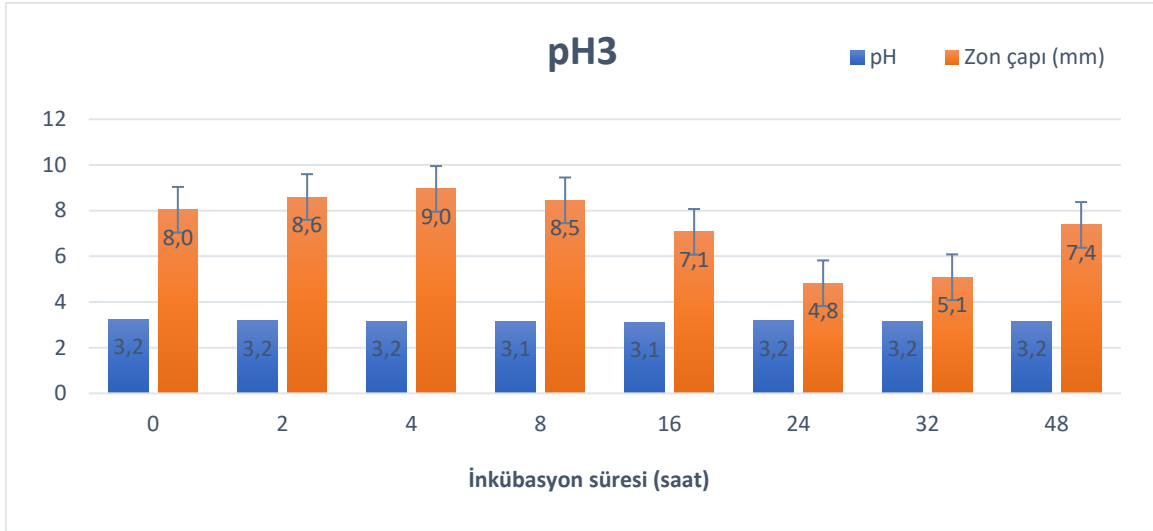
Şekil 4.13 24 no.lu LAB suşunun pH6'daki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği



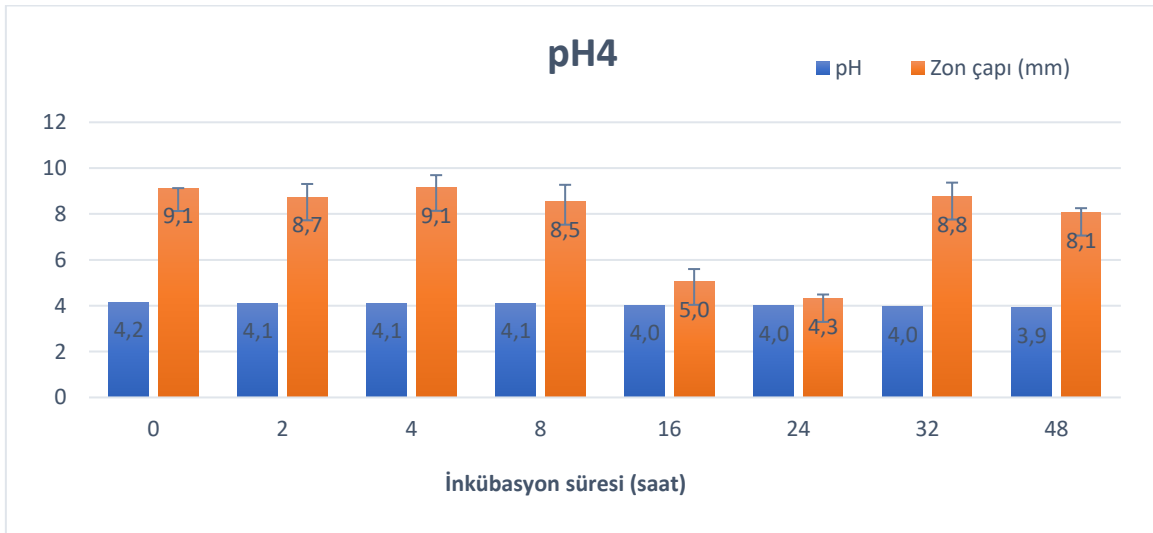
Şekil 4.14 24 no.lu LAB suşunun pH7'deki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği



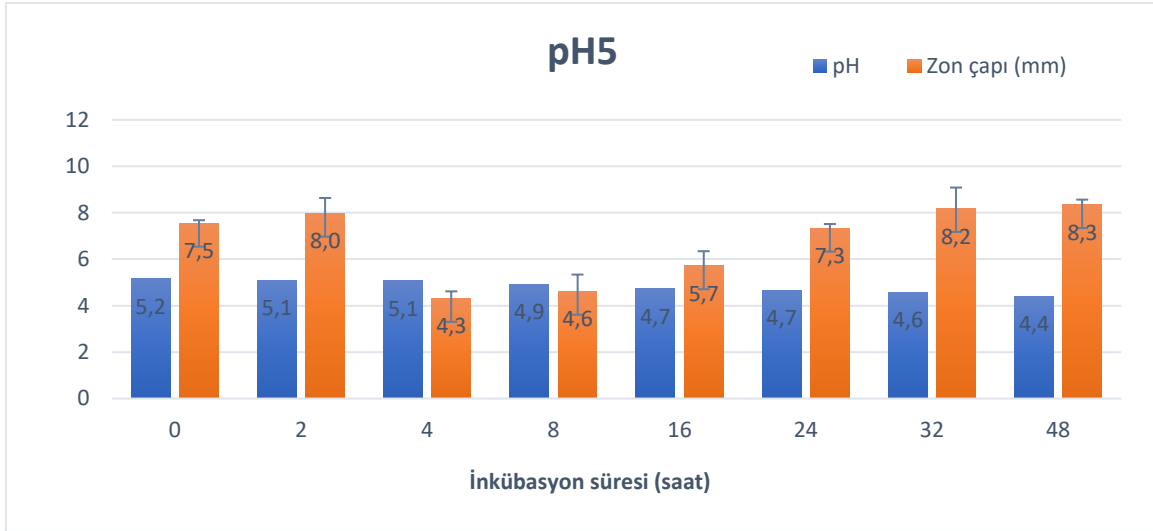
Şekil 4.15 24 no.lu LAB suşunun pH8'deki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği



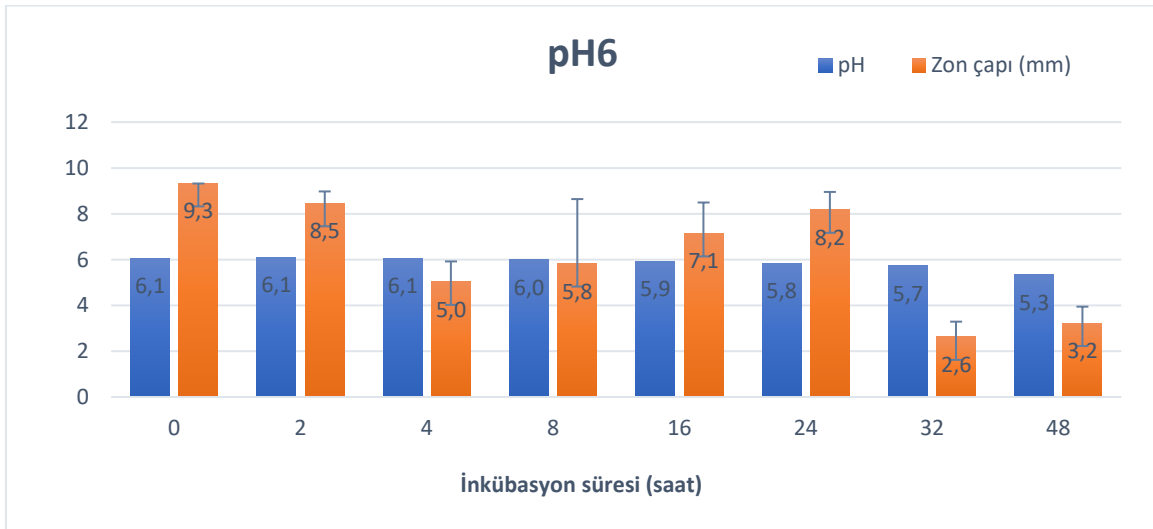
Şekil 4.16 68 no.lu LAB suşunun pH3'teki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği



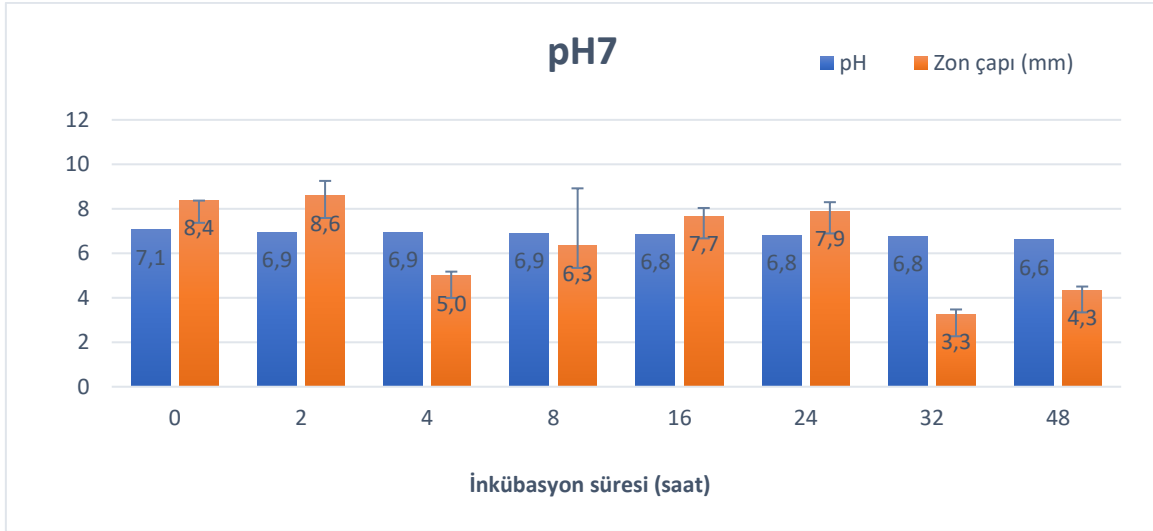
Şekil 4.17 68 no.lu LAB suşunun pH4'deki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği



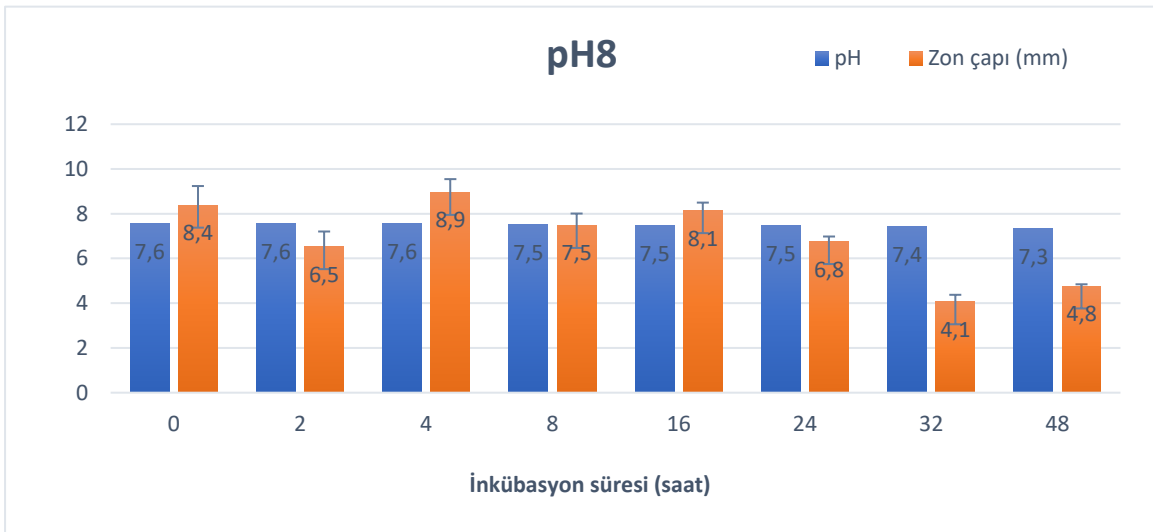
Şekil 4.18 68 no.lu LAB suşunun pH5'teki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği



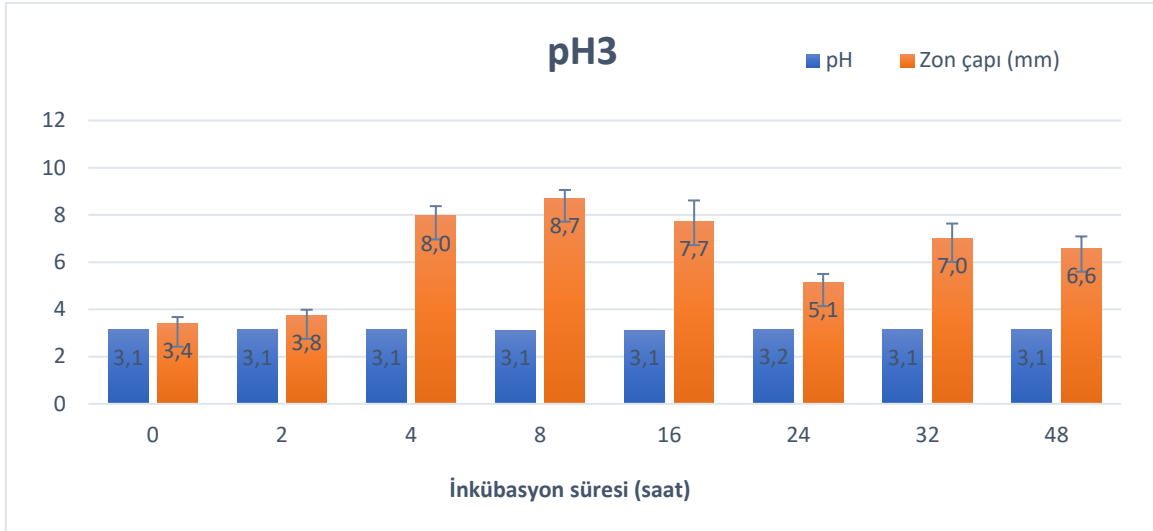
Şekil 4.19 68 no.lu LAB suşunun pH6'daki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği



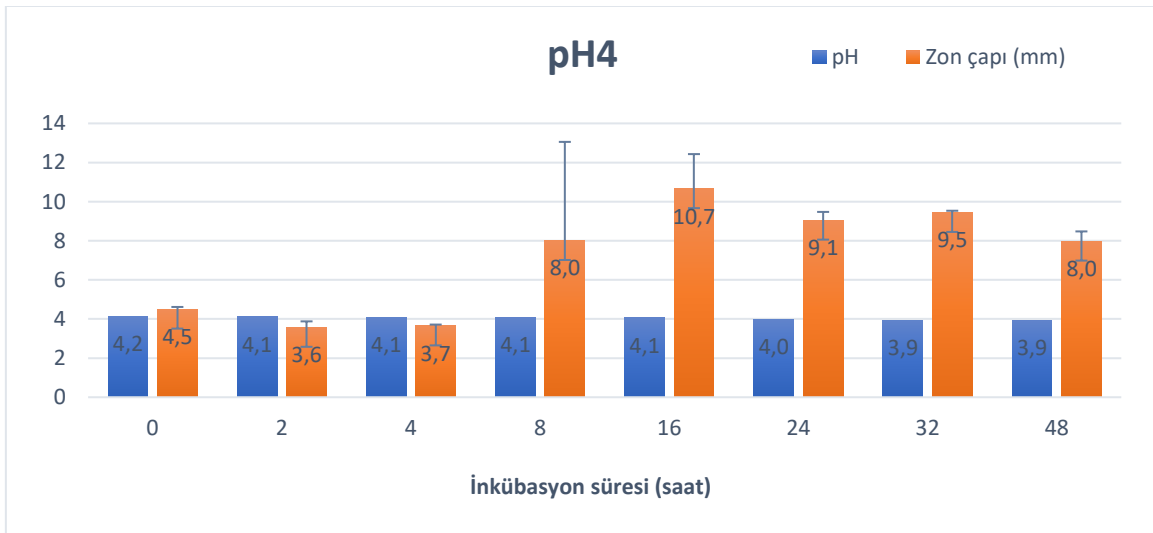
Şekil 4.20 68 no.lu LAB suşunun pH7'deki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği



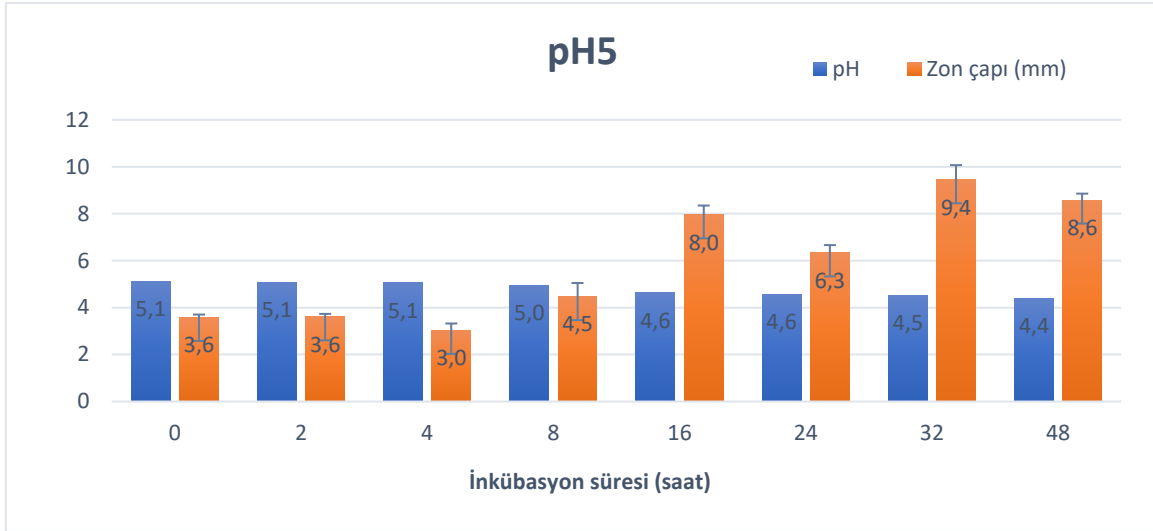
Şekil 4.21 68 no.lu LAB suşunun pH8'deki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği



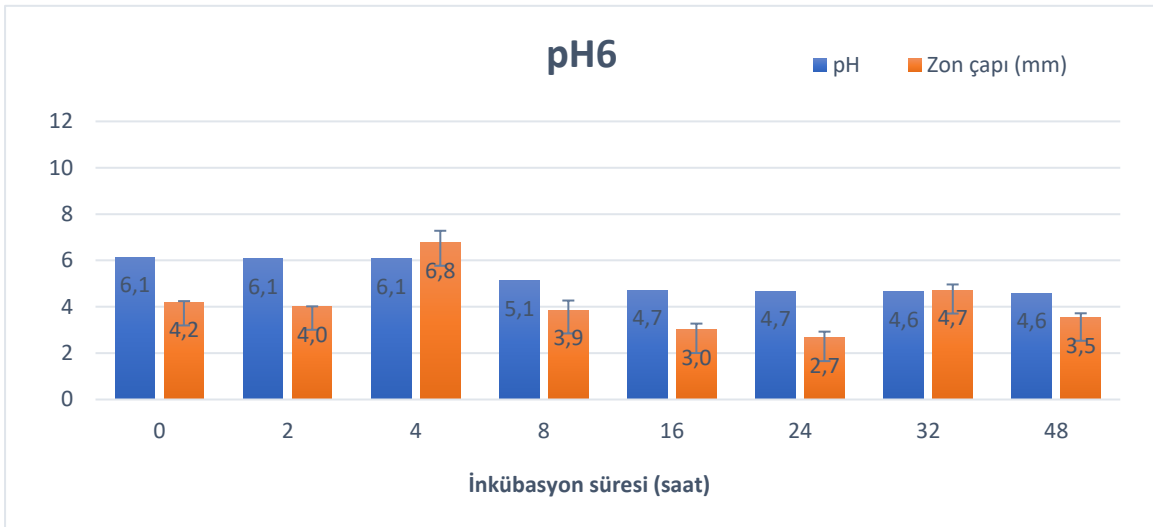
Şekil 4.22 107 no.lu LAB suşunun pH3'teki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği



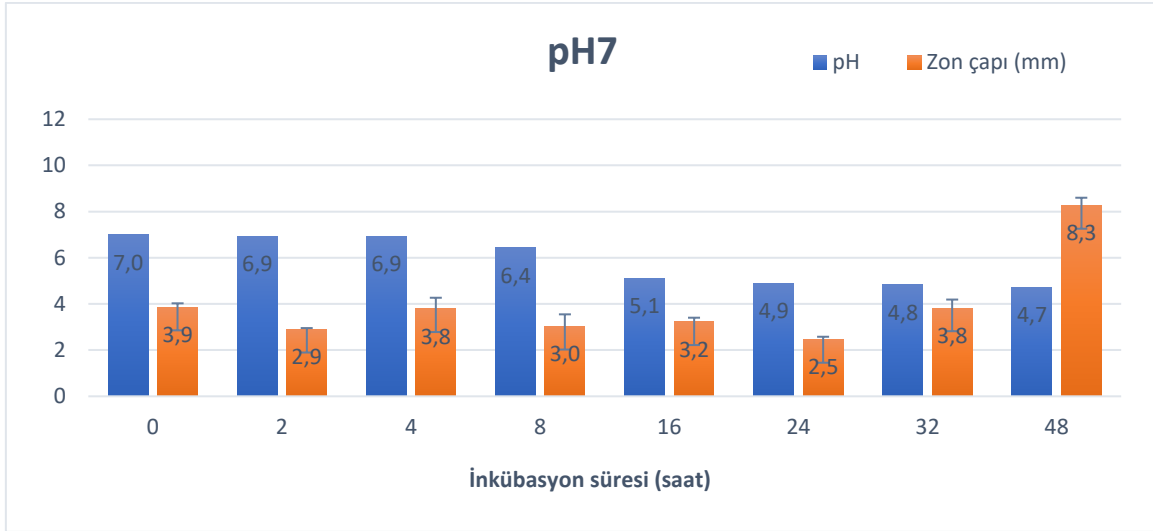
Şekil 4.23 107 no.lu LAB suşunun pH4'deki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği



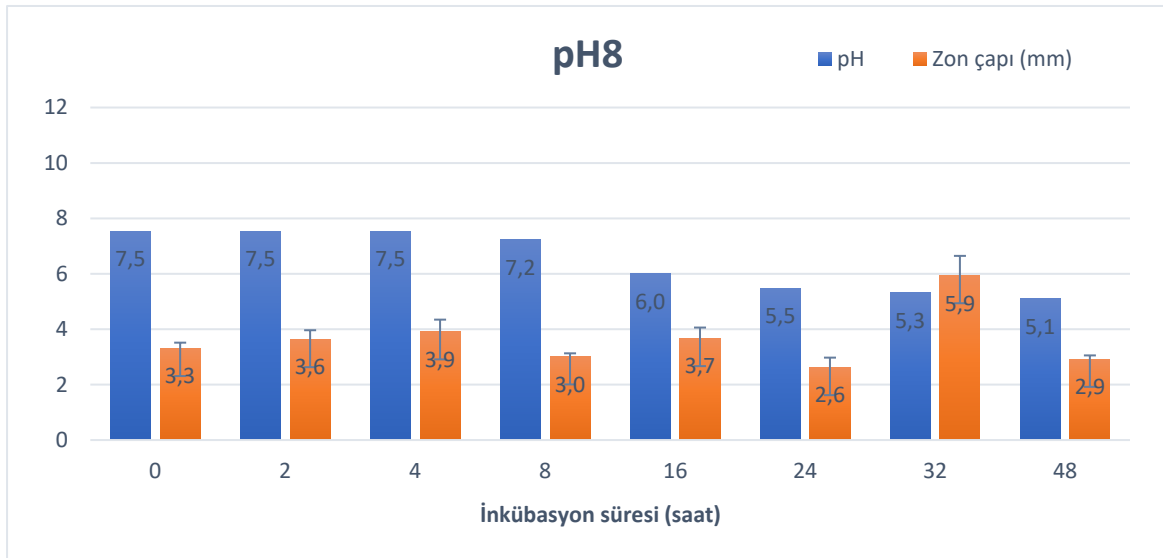
Şekil 4.24 107 no.lu LAB suşunun pH5'teki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği



Şekil 4.25 107 no.lu LAB suşunun pH6'daki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği



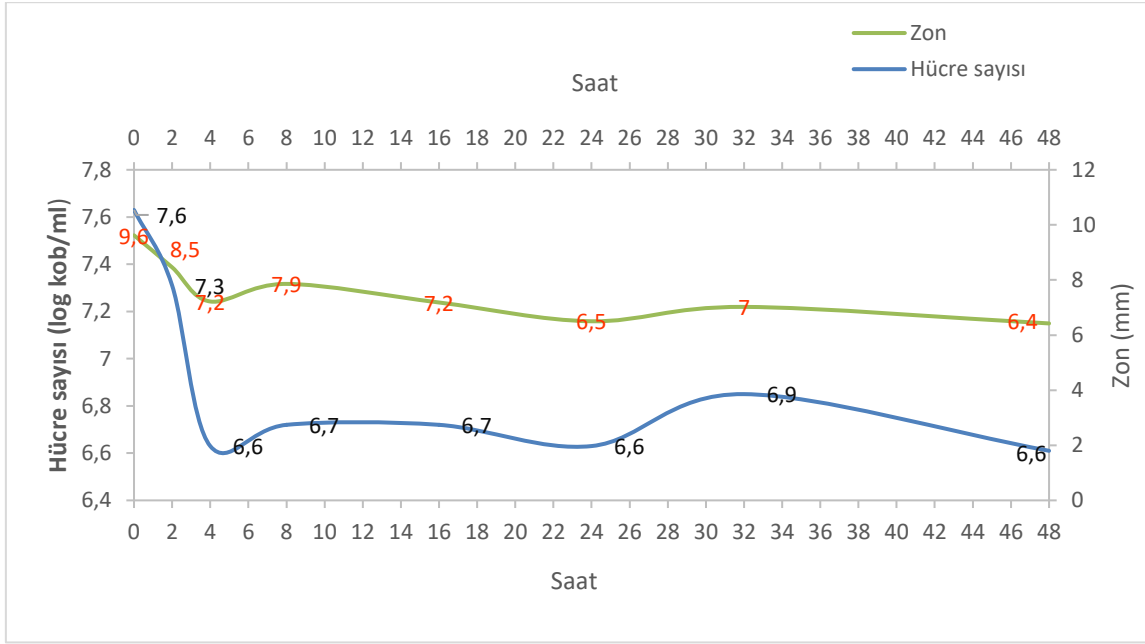
Şekil 4.26 107 no.lu LAB suşunun pH7'deki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği



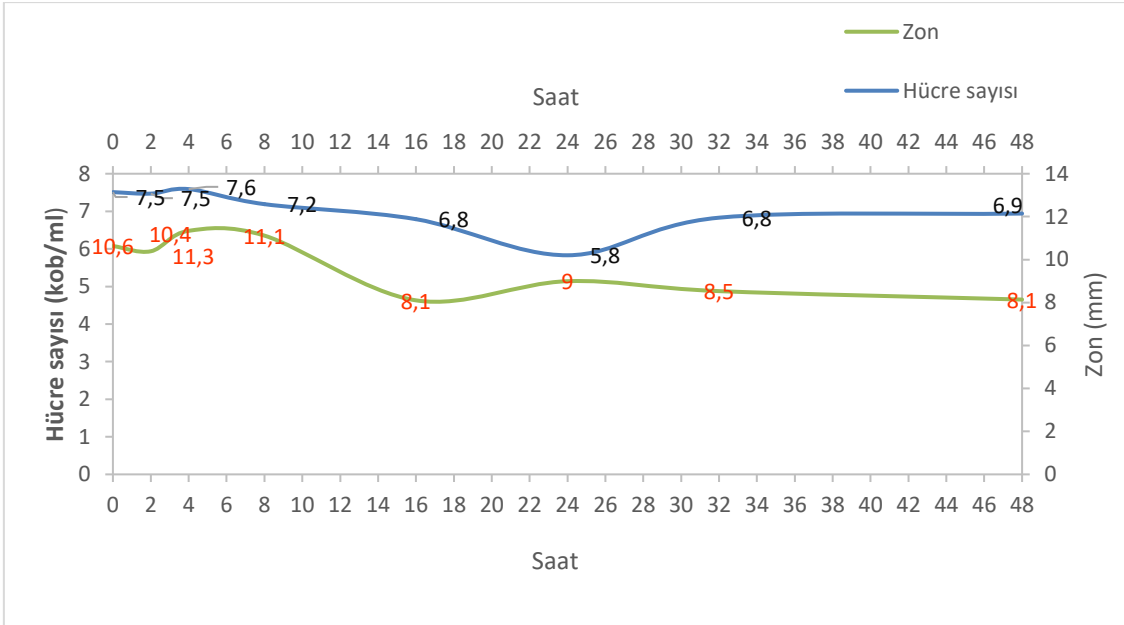
Şekil 4.27 107 no.lu LAB suşunun pH8'deki üremesine bağlı pH ve hidroliz zon çapı değişim grafiği

Daha sonra, suşlarımızın canlı kalabildiği mide pH'ı dikkate alınarak, 23 ve 107 no.lu LAB suşları pH'ı 3 ve 4 olan GB-2 besiyerlerine ekilmiştir. pH3 ve pH4 olan GB-2 kültürlerinden, inkübasyonun 0., 2., 4. 8., 16., 24., 32. ve 48. saatlerinde örnekler alınmış ve bu örneklerdeki canlı hücre sayısı belirlenmiştir. Aynı örneklerin gluten hidrolizi de test

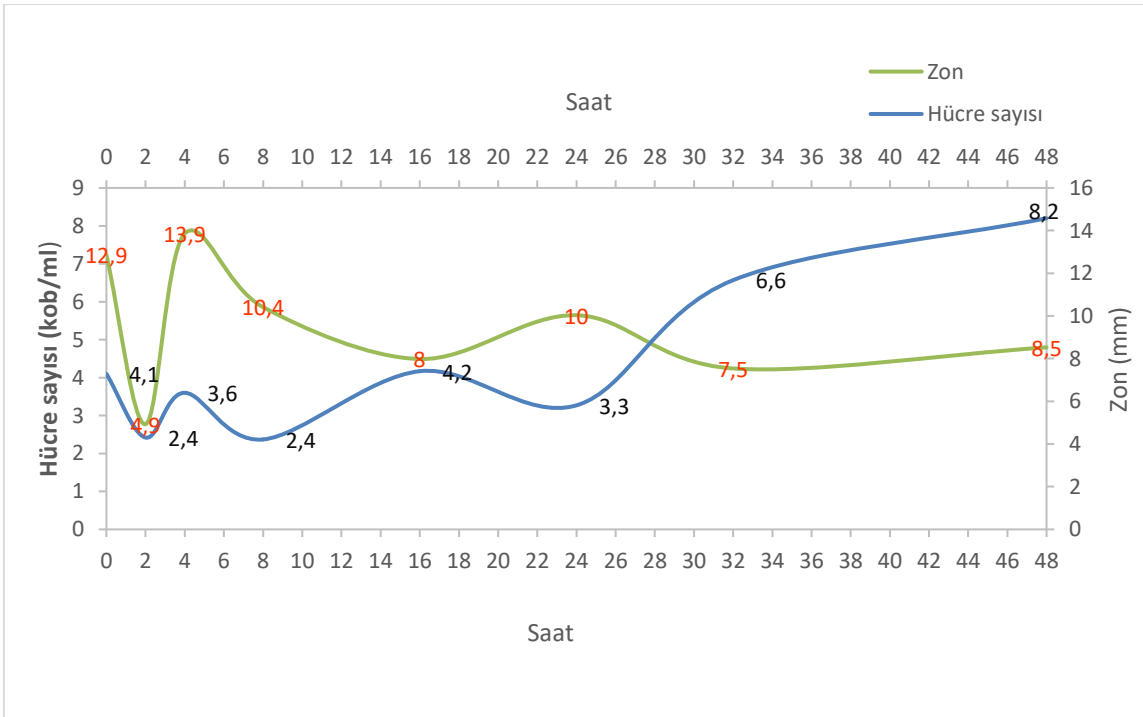
edilmiştir. 23 ve 107 no.lu LAB suşlarının büyüme eğrisi oluşturulmuş ve bu büyüme eğrisindeki zaman aralıklarına karşılık gelen hidroliz zon çapları Şekil 4.28 - Şekil 4.31’de verilmiştir. Grafiklere bakıldığında zamana bağlı olarak canlı hücre sayısı ile zon çapı arasında doğru orantı vardır.



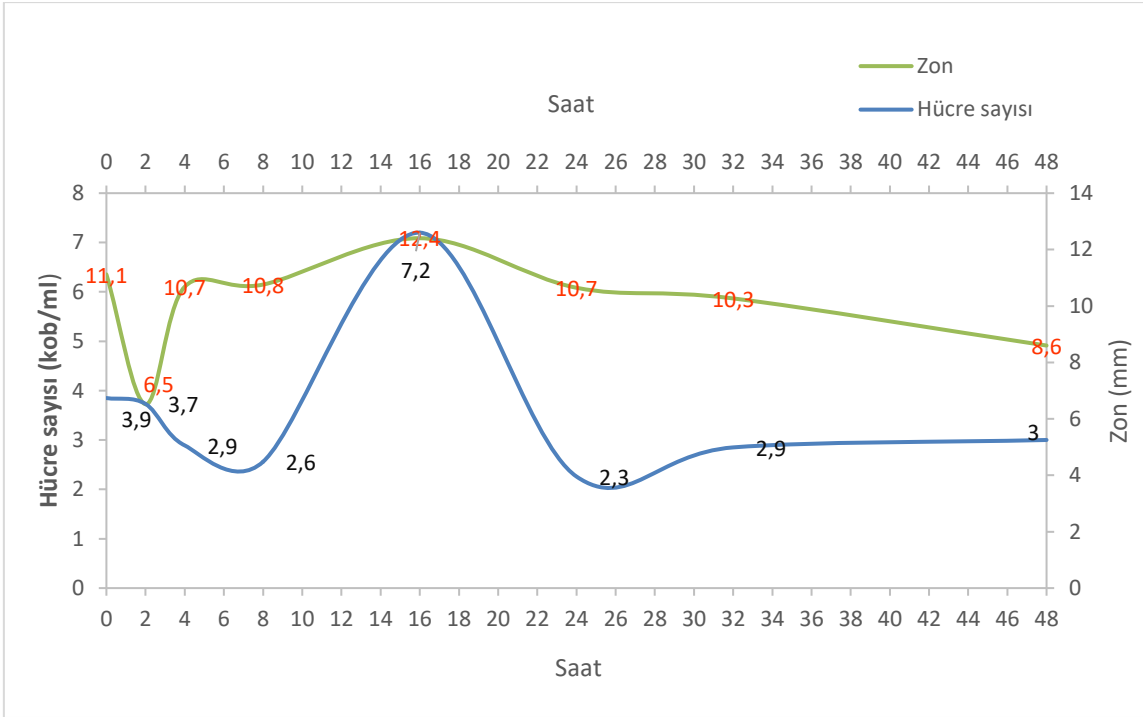
Şekil 4.28 23 no.lu LAB suşunun pH3 canlı hücre sayımı-zon grafiği



Şekil 4.29 23 no.lu LAB suşunun pH4 canlı hücre sayımı-zon grafiği



Şekil 4.30 107 no.lu LAB suşunun pH3 canlı hücre sayımı-zon grafiği



Şekil 4.31 107 no.lu LAB suşunun pH4 canlı hücre sayımı-zon grafiği

4.8. Seçilen suşlarla ELISA test kitleri kullanılarak 33-mer peptid degradasyonunun belirlenmesi

Gluten ve gliadin hidrolize edebilen suşların bu aktivitesi şimdiye kadar yaptığımız çalışmalarda kalitatif olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada ise seçilmiş suşların, gliadindeki başlıca immünojenik peptid olan, glutamin ve pirolince zengin, 33-mer peptidleri hidrolize etme yeteneği kantitatif olarak belirlenmiştir. 38 ve 107 no.lu suşlarla inkübasyon sonrası kızılıtan unundaki 33-mer peptid miktarı kontrolle (inoküle edilmemiş kızılıtan unu) karşılaştırılmış ve 33-mer peptid konsantrasyonları arasında karşılaştırma yapılmıştır. Bu testlerin sonucuna göre 38P no.lu suş 33-mer peptid miktarını 495,2 mg/dL'den 431,6 mg/dL'ye düşürdüğü görülürken, 107 no.lu suşun 369,9 mg/dL'ye düşürmüştür. Bu sonuçlar, denenen suşların 33-mer peptidlerini hidrolize edebildiğini göstermiştir. Bu deneyin sonuçları Şekil 4.17'de ve Çizelge 4.20'de görülmektedir.

Çizelge 4.20 Probiyotik özellikleri ve gluten hidroliz yeteneği dikkate alınarak seçilen 38 ve 107 nolu suşların, kızılta unundaki 33-mer peptidleri degradasyon yeteneğinin Agraquant ELISA test kiti ile belirlenmesi

Kuyu adı	Örnek adı	Absorbans	Konsantrasyon (mg/dL)
A	Standart 1	0,048	0,0
B	Standart 2	0,254	4.0
C	Standart 3	0,746	20.0
D	Standart 4	1,221	80.0
E	Standart 5	1,680	200.0
F	38P	2,566	431,6
G	107	2,330	369,9
H	Kontrol (kızılta unu)	2,809	495,2



Şekil 4.32 38P ve 107 nolu suşların, kızılta unundaki 33-mer peptid degradasyonunun AgraQuant® Gluten G12 kiti ile belirlenmesi (A-H arasındaki kuyularda, standart 1-5; F-H kuyularında 38P, 107 ve kontrol bulunmaktadır)

Halbmayr-Jech vd.'nin (2012) yaptığı bu çalışmada çölyak hastalığına neden olan immünotoksik peptidlere karşılık geliştirilen G12 adında bir monoklonal antikor, sandviç ELISA yöntemini geliştirmek amacı ile kullanılmıştır. G12, glutenin immünotoksitesinin neden olduğu α 2-gliadin'den 33-mer peptid'i tespit etmektedir.

Monoklonal G12 antikorunu kullanılan sandviç ELISA'da bir numunede glutenin analizi için önemli ve umut vaat eden sonuçlar verdiği belirtilmiştir. Monoklonal G12 sandviç ELISA testi, Avrupa'da gluten içermeyen gıdalar için yapılan düzenlemelerde sınır değerlerin belirlendiği bir zamanda “glutensiz” etiketlemelerin yapılacağı gıdaları desteklemek için çok dikkat çekici aday bir yöntem vurgusu yapılmıştır.

Dünya çapında ÇH, diyetin tek tedavi yöntemi olduğu gıda intoleranslarından biridir. Bu nedendir ki farklı ve yeni birçok yaklaşımların araştırılması önceliktir. Bunlardan biri de gluten proteinlerinin hidrolizi için proteinazların kullanılmasıdır. Mickowska vd.'nin (2016) yaptıkları çalışmada; *Bacillus stearothersophilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thermoproteolyticus* ve *Streptomyces griseus*'tan mikrobiyal proteazların kullanılarak buğday, arpa, çavdar, tritikale ve yulaftan ekstrakte edilerek prolaminlerin enzimatik parçalanmasını denemişlerdir. Prolaminler mikrobiyal proteazlar tarafından hidrolize edilerek daha küçük moleküller ve peptidler oluşturmuştur (<30,000 Da). Proteoliz ürünlerinin immünoaktivitesi Western blot ve sandviç ELISA analizi (monoklonal antikor R5 ve AgraQuant®Gluten G12 ticari bir kit RIDASCREEN® Gliadin) ile poliklonal ve monoklonal antikorlarla reaksiyon sonuçlarına göre değerlendirilmiştir. Değerlendirmeler sonucunda monoklonal G12 antikorunu, R5 antikoruna göre daha yüksek immüno kimyasal aktivite tespit etmiştir. Fakat proteinazların proteolitik aktivitesine bakıldığında eldeki sonuçların uyumlu olduğu belirtilmiştir. Çalışma, immüno kimyasal analizler prolaminlerdeki çölyak hastalığında aktif olan amino asit dizilerinin kısmen yok olduğu ve toksisitesini yitirdiğini doğrulamıştır. Mikrobiyal proteazların kullanılması, prolaminlerin çölyak hastalığındaki aktivitesini azaltması için alternatif bir yöntem olabilir denmiştir.

4.9. Probiyotik nitelikleri ve gluten hidroliz yeteneği açısından seçilen suş ile yapılan *in vivo* enfeksiyon denemeleri

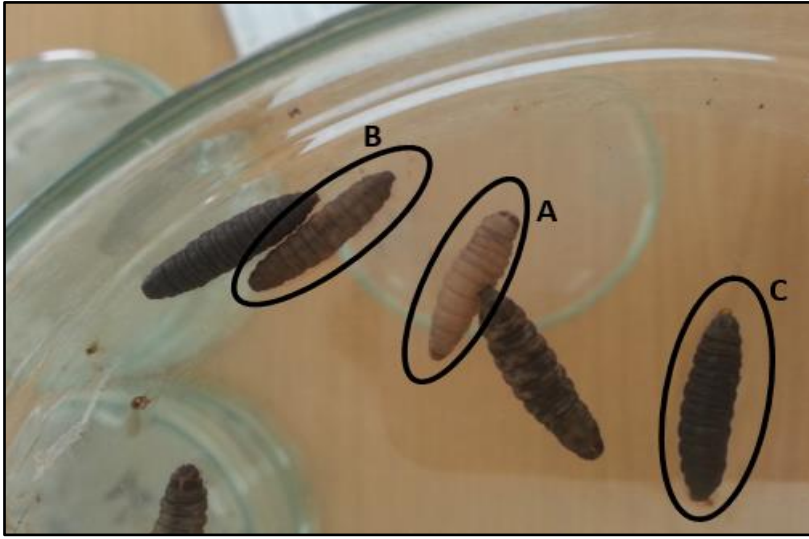
4.9.1. *G. mellonella* üzerine 107 nolu suşun enfektif dozunun belirlenmesi

G. mellonella larvalarında probiyotik bakteri ve patojen test bakterisinin enfektif dozunun belirlenmesi: Uygun ağırlıkta olan *G. mellonella* larva gruplarına yapılan . *E. coli* O157:H7 suşuna karşı 107 no.lu LAB suşu doz deneme çalışmasında 37°C'de 27-72 saat

inkübasyon sonunda canlı-hasta ve ölü larva sayısı yüzde olarak Çizelge 4.21’de verilmiştir. Canlı: sağlıklı ve krem rengi larvalar -, hasta: yaşayan ama az hareket eden ve rengi gri-siyah olan larvalar, ölü: hareketsiz ve siyah renkli larvalar olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.18). Deney gruplarındaki suşların doz miktarları kob/ml cinsinden verilmiştir.

Çizelge 4.21 *G. mellonella* larvası üzerine *E.coli* O157:H7 ve 107 no.lu LAB suşunun enfektif dozlarının belirlenmesi

Deney Grupları	CANLI (%)			HASTA (%)			ÖLÜ (%)		
	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün	1.gün	2.gün	3.gün
Muamelesiz	100	100	100	0	0	0	0	0	0
SF	100	100	100	0	0	0	0	0	0
107 nolu suş- (10 ⁶)	100	97,92	97,92	0	0	0	0	2,08	2,08
107 nolu suş- (10 ⁷)	97,92	97,92	93,75	0	0	0	2,08	2,08	6,25
107 nolu suş- (10 ⁸)	100	100	100	0	0	0	0	0	0
107 nolu suş- (10 ⁹)	97,92	95,83	95,83	2,08	4,17	0	0	0	4,17
<i>E. coli</i> O157:H7- (10 ³)	54,17	39,58	39,58	37,50	43,75	43,75	8,33	16,67	16,67
<i>E. coli</i> O157:H7- (10 ⁴)	6,25	6,25	6,25	50	33,33	33,33	43,75	60,42	60,42
<i>E. coli</i> O157:H7- (10 ⁵)	8,33	6,25	0	25	16,67	22,92	66,67	77,08	77,08



Şekil 4.33 *G. mellonella* larvaları (A: Canlı B: Hasta C: Ölü)

4.9.2. *G. mellonella* üzerine tedavi edici ve koruyucu etki çalışması

Bu *in vivo* çalışmada, öncelikli olarak doz deneme çalışması ile kullanılacak dozlar belirlenmiştir. Konak *G. mellonella* larvası ile tedavi edici ve koruyucu etki çalışmasındaki enjekte edilen patojen *E. coli* O157:H7 suşu için hücre yoğunluğu tek doz olarak 10^3 kob/ml'ye karar verilmişken bu doza karşılık probiyotik suş olarak kullanılan koko-basil formda gram pozitif bir laktik asit bakterisi olan 107 no.lu suşun hücre yoğunluğu dozu ise; 10^3 kob/ml ve 10^6 kob/ml olarak iki farklı doz çalışılmıştır. 24 saat sonunda hayatta kalma, hasta ve ölü olarak kayıt altına alınmıştır.

Her bir doz grubu 3 paralel olarak çalışılmıştır. Her bir grup için 16 sağlıklı larva seçilmiştir. Ayrıca hiçbir muamele görmemiş grup ve hücre yoğunluklarını ayarlamak için kullanılan serum fizyolojik enjekte edilen grupta kontrol grupları olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.22'de verilmiştir.

Konak olarak *G. mellonella* larvası ile yapılan bu *in vivo* çalışması sonucunda probiyotik olarak kullanılan 107 no.lu LAB suşunun, *E. coli* O157:H7 patojeninin neden olduğu enfeksiyon sonucu meydana gelen hemorajik kolit hastalığının tedavisinde koruyucu ya da tedavi edici sağlığa yararlı bir alternatif olarak sunulurken, kullanılabileceğini göstermiştir.

Çizelge 4.22 *G. mellonella* larvası ile tedavi edici ve koruyucu etki çalışması (*E. coli* O157:H7 suşuna karşı 107 no.lu LAB suşu)

Deney Grupları		24 saat		
		CANLI (%)	HASTA (%)	ÖLÜ (%)
Koruyucu Etki	107 no.lu suş (10^6) + <i>E. coli</i> O157:H7 (10^3)	90,63	3,12	6,25
	107 no.lu suş (10^3) + <i>E. coli</i> O157:H7 (10^3)	90,63	6,25	3,12
Tedavi Edici Etki	<i>E. coli</i> O157:H7 (10^3) + 107 no.lu suş (10^6)	93,75	6,25	0
	<i>E. coli</i> O157:H7 (10^3) + 107 no.lu suş (10^3)	84,38	9,37	6,25
Kontroller	Muamelesiz	100	0	0
	SF	100	0	0
	107 no.lu suş (10^6)	100	0	0
	107 no.lu suş (10^3)	100	0	0
	<i>E. coli</i> O157:H7 (10^3)	50	10	40

Tıp ve hasta sağlığını geliştirme çalışmaları planladığında biyomedikal araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılacak birçok çalışmada kullanılacak protokollerde deney hayvanı kullanımı gerekmektedir (fareler, sıçanlar, kobaylar vb.). İnsanlar üzerinde etik nedenlerden dolayı bu çalışmalar yapılmamaktadır. Denenmesi hedeflenen farklı alanlardaki örneklerin ise hayvanlara zarar ve acı verdikleri bilinmektedir. Hayvan deneylerinde hayvanların sağlığını korumak önceliktir (Yiğit vd., 2015).

Russell ve Burch'un (1959), "3R prensibi" (replacement, reduction, refinement) ; hayvan kullanımını ve hayvanlara acı çektirilmesini en aza indirmek için yapılması gerekenleri vurgulamış ve bu prensibin dünyada olduğu gibi Türkiye'de de hayvan yaşamı ile ilgili yasal olarak düzenlemelerin temelini oluşturmuştur.

Türkiye'de 3A (Alternatif arama, azaltma ve arındırma) olarak geçen bu prensip, deney hayvanlarının kullanımında olabildiğince alternatif yöntemlerin kullanılmasını ve kullanılacak hayvanların sayısını en aza indirerek maruz kalabilecekleri olumsuz şartları arındırmayı amaçlamaktadır (Yiğit vd., 2015).

Bakteriyel hastalık oluşturma çalışması genellikle uygun bir hayvan modeli gerektirmektedir. Memeli enfeksiyon modelleri hem etik sorunları hem de maliyetleri gündeme getirmektedir. Böceklerin enfeksiyon modeli olarak kullanılması değerli ve önemli bir alternatif sağlamaktadır. Nematodlar gibi diğer omurgalı olmayan model konakçılarla karşılaştırıldığında, böcekler daha gelişmiş bir antimikrobiyal savunma sistemine sahiptir. Bu nedenle memeli enfeksiyon süreciyle ilgili doğru bilgiler verme olasılıkları daha yüksektir. Böcek larva orta bağırsakların epitel hücreleri ile memelilerin sindirim sistemleri bağırsak hücreleri arasında benzerlikler bulunmaktadır. Son olarak, hücre yapışması, antimikrobiyal peptidlere direnç, doku bozulması ve oksidatif strese adaptasyon gibi bakteriyel enfeksiyon süreci için gerekli olan belli başlı temel bileşenler, hem böceklerde hem de memelilerde önemlidir. Bütün bu bilgilerden yola çıkarak böcekler, memeli enfeksiyonlarında rol oynayan mikrobiyal hastalık oluşturma faktörlerinin tanımlanması ve karakterizasyonu için çok değerli araçlardır (Ramarao vd., 2012).

Bu bilgiler doğrultusunda birçok bilim insanı memeli canlıları diğer modeller ile değiştirmeyi hedeflemektedir. Yapılan çalışmaları bu yönde geliştirmektedir. Yaygın olmayan bu hayvan modellerin kullanımında sinirsel bir sisteme sahip olmadıkları için biyoetik sorunlara maruz kalmadıkları ya da sinir sistemi varsa bile çok ilkel olup neredeyse hiç ağrı hissi yaşamadıkları için alternatif olarak değerlendirilmektedir.

Günümüzde bu alternatif modellerin kullanılmasında en sık kullanılan model organizma olarak karşımıza Lepidoptera takımına ait *G. mellonella* (Büyük bal mumu güvesi) çıkmaktadır (Alvandian vd., 2016)

G. mellonella mikrobiyal enfeksiyonları incelemek için alternatif bir model olarak tanıtılmıştır. *G. mellonella* larvaları kolayca ve ucuza temin edilebilmektedir. Etik açıdan bir kısıtlama yoktur. Özel laboratuvar ekipmanına ihtiyaç duyulmadığı için kullanımı kolaydır. Kısa yaşam döngüleri onları büyük ölçekli çalışmalar için ideal kılar. Bir bağışıklık tepkisine sahip değillerdir ancak doğuştan gelen bağışıklık tepkileri, omurgalılardaki bağışıklık tepkisi ile dikkate değer benzerlikler göstermektedir (Tsai vd., 2016).

Beeton vd. (2015) *G. mellonella* enfeksiyon modelini, *P. aeruginosa* suşlarına karşı faj tedavisinde *in vivo* etkinliğini belirlemek amacı ile kullanmışlardır. Çalışma sonucunda *G. mellonella*'nın, düşük enfektif dozlarla diğer patojenlere uygulanabilen *P. aeruginosa* hedefli faj tedavisinde ilk *in vivo* incelenmesi için basit, sağlam ve uygun maliyetli bir model olarak kullanımını doğruladığı belirtilmiştir.

Yapılan bir çalışmada fırsatçı patojen olan *Klebsiella pneumoniae*'nin virülans mekanizmaları ve virülans sürecinin yönlerini araştırmak için omurgasız konak model olarak *G. mellonella* kullanılmıştır. *G. mellonella* doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bir özelliği olan melanizasyon ve bağışıklıktan kaçmanın bir belirteci olarak çoğalma yeteneği de hayatta kalmasının geniş ölçüde ilişkili olduğu belirtilmiştir. Çalışma sonucunda *G. mellonella*'nın virülans mekanizmaları hakkında önemli bilgiler verebildiğini ve bunun fırsatçı insan patojenlerinin incelenmesine uygulanabileceğini ifade edilmiştir (Wand vd., 2013).

Bir başka çalışmada yüksek düzeyde ilaca dayanıklı bakterilerin kliniklerde ortaya çıkan antibiyotiğe dirençli bakterilere karşı tedavi etmek amacı ile bakteriyofajların terapötik kullanımı amaçlamıştır (Nale vd., 2016).

Alghoribi vd. (2014) *G. mellonella* larvasını kullanarak önde gelen beş üropatojenik *E. coli* (UPEC) soyundan 71 suşun patojenitesini incelemiştir. Bu çalışma, *G. mellonella*'nın *E. coli* (UPEC) virülansının araştırılması için mükemmel bir araç olduğunu göstermiştir.

Burkholderia, topluca *Burkholderia cepacia* kompleksi (BCC) olarak adlandırılan karmaşık bir taksonomiye sahip önemli bir bakteri cinsidir. Bu bakteriyel mikroorganizma

kompleksinin virülansını derinlemesine araştırmak için alternatif enfeksiyon modeli olarak yararlı *G. mellonella* larvaları kullanılmıştır. BCC virülans seviyeleri, %50 öldürücü dozlar kullanılarak belirlendi ve BCC'nin hem türü hem de suşları arasında farklılıklar gözlemlenmiştir. Elde edilen BCC patojenite eğilimleri, diğer yayınlanmış alternatif enfeksiyon modelleri ve memeli enfeksiyon modelleri kullanılarak elde edilen sonuçlarla karşılaştırılınca olumlu sonuçlar vermiştir. BCC'nin öldürücü özelliklerini incelemek yapılacak çalışmalarda, *G. mellonella*'nın faydalı bir alternatif enfeksiyon modeli olduğunu kanıtlamıştır (Seed ve Dennis, 2008).

Bir başka çalışmada, *G. mellonella* larvalarının, *C. perfringens* suşlarının virülansını ve yeni tedavi yöntemlerini çalışmak için uygunluğunu, veri toplamaya yönelik geliştirilmiş bir hızlı yaklaşım ile ne ölçüde kullanılabilir olduğunu belirlemeyi amaçlamışlardır. Bulgular, *G. mellonella*'nın yararlı bir *in vivo* enfeksiyon modeli olabileceğini ve *C. perfringens* suşlarının virülansı için ön tarama testi olarak ya da yeni terapötiklerin ilk aşamasında geliştirilmek üzere basit, ucuz ve hızlı bir *in vivo* yöntem olduğunu konusundaki uygunluğunu belirtmişlerdir (Kay vd., 2019).

Berrios vd. (2018) bal arısı bağırsaklarından izole edilen yeni bir *Lactobacillus* türü olan *Lactobacillus kunkeei*'nin *in vitro* biyofilm oluşumunu çalışmışlardır. Ayrıca *L. kunkeei* biyofilminin *P. aeruginosa* biyofilmlerinin oluşumunu engellediği belirtilmiştir. Son olarak, *L. kunkeei* suşlarının *G. mellonella* larva modeli kullanılarak yapılan çalışmada *P. aeruginosa* enfeksiyonunu, *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunu ya da stabilitesini etkileyerek hafiflettiğini bildirilmiştir. *L. kunkeei* bir probiyotiğin özelliklerini sağladığı için, bu *Lactobacillus* türünün hem hayvanlarda (böcekler dahil) hem de insanlarda kullanımının *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunun engellenmesine katkıda bulunabileceğini göstermiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

ÇH, genetik olarak yatkın kişilerde ortaya çıkan kronik bir otoimmün hastalıktır. Günümüzde bu hastalığın tedavisi bulunmamaktadır. Hassas bireylerin ömür boyu glutensiz bir diyetle uyum göstermeleri gerekmektedir. ÇH ve ÇH-olmayan gluten hassasiyetine bağlı olan semptomların giderilmesi ya da azaltılmasına yönelik olarak probiyotik takviyelerin kullanımı son zamanlarda umut vaat eden bir yaklaşım olmuştur. Bu nedenle bu çalışmada farklı un, ekşi maya, hamur ve peynir örneklerinden izole edilmiş LAB suşlarının gluten hidroliz yetenekleri ve probiyotik özellikleri belirlenmiştir.

Öncelikle farklı un, ekşi maya ve hamur örneklerinden mikroorganizma izolasyonu yapılmıştır. Ayrıca peynirden izole edilmiş bazı LAB suşları da çalışmaya dahil edilmiştir. Suşlar içinde buğday gluteni bulunan GA-1 ekilmiş ve inkübasyonun ardından plaklar Coomassie Blue Brilliant R-250 protein boyası ile boyanmıştır. GA-1 plaklarında gelişen kolonilerin çevrelerinde meydana gelen renksiz/boyasız zonlar gluten hidrolizini işaret etmiştir. Örneklerden izole edilmiş toplam 119 adet gram pozitif bakteri suşundan 43'ü gluteni hidrolize edebilmiştir. Ayrıca, bu suşlar, içinde tek azot kaynağı olarak gluten bulunan Gluten Agar-2 (GA-2) plaklarına inoküle edilmiş ve hem aerobik hem de anaerobik koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda plaklar Coomassie Blue Brilliant R-250 ile boyanmıştır. Bu 43 suşun hem aerobik hem de anaerobik koşullarda gluteni hidrolize edebilen LAB suşları olduğu belirlenmiştir.

Daha sonra bu suşların bazı temel probiyotik özellikleri araştırılmıştır. Düşük pH da (pH1-4), safra tuzlarında (%0,3-0,6) ve yapay mide sıvısında (pH2 ve 3) canlı kalan suşlar arasından en iyi olanları seçilmiş (11P, 16P, 38P, 104P, 16, 23, 24, 28, 65, 68, 107 ve 108) ve bunlar sonraki çalışmalarda kullanılmıştır.

Suşlardan otoagregasyon kapasitesi ve hidrofobisitesi en yüksek olanlar, sırasıyla, 108 (%23,9) ve 24 no.lu (%99,2) suşlardır. Suşların çoğunluğu, anaerobik koşuldakine oranla, aerobik koşulda daha geniş proteoliz zon çapları oluşturmuştur. 23, 24, 68 ve 107 no.lu suşlar pH'ı 3-8 arasında değişen GB-2 besiyerlerine ekilmiş ve tüm pH seviyelerinde gluten hidrolizi meydana geldiği belirlenmiştir.

38P no.lu suş 33-mer peptidlerin miktarını 495,2 mg/dL'den 431,6 mg/dl'ye düşürdüğü görülürken, 107 no.lu suş 369,9 mg/dl'ye düşürmüştür.

107 no.lu suşun, konağı enfeksiyondan koruyucu/tedavi edici etkisi (*E. coli* O157:H7'ye karşı) ve enfektif dozunu belirlemek için *G. mellonella* larvaları kullanılmıştır. Konak olarak kullanılan *G. mellonella* larvalarına 107 no.lu suş (10^3 kob/ml) ve *E. coli* O157:H7 (10^3 kob/ml) birlikte verildiğinde, koruyucu etki için belirlenen canlı larva yüzdesi %91 iken, tedavi edici etki %84 olmuştur.

Sonuç olarak, bu çalışmada izole edilen 39 LAB suşunun ve peynir örneklerinden izole edilmiş 4 LAB suşunun gluten hidrolize edebilen ve temel probiyotik nitelikleri taşıyan suşlar olduğu belirlenmiştir. Bu suşların tamamının, glutensiz ya da gluteni azaltılmış fırıncılık ürünlerinin mayalandırılmasında “ekşi maya” olarak kullanım olanağı bulunmaktadır. Daha da önemlisi 23, 24, 68 ve 107 no.lu suşların, tek başına ya da kombine edilerek, gluten duyarlılığı olan bireyler için probiyotik takviye olarak kullanım potansiyeli vardır. Gelecekte yapılması planlanan çalışmalar, suşların bu potansiyellerinin daha detaylı bir şekilde ortaya konmasına yönelik olacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abanoz, H.S., 2014, *Enterococcus faecalis* KT11'in probiyotik potansiyelinin belirlenmesi ve bakteriyosin üretimi üzerine çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, ESOGÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, 21-86.
- Abouloifa H, Rokni Y, Bellaouchi R, Ghabbour N, Karboune S, Brasca M, Salah RB, Chihib NE, Saalaoui E, Asehraou A 2020, Characterization of probiotic properties of antifungal *Lactobacillus* strains isolated from traditional fermenting green olives. *Probiotics Antimicrob Proteins* 12:683–696.
- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., Sonomoto, K. 2013, Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology advances*, 31(6), 877-902.
- Ahl, D., Liu, H., Schreiber, O., Roos, S., Phillipson, M., Holm, L., 2016, *Lactobacillus reuteri* increases mucus thickness and ameliorates dextran sulphate sodium-induced colitis in mice, *Acta Physiologica*, 217(4): 300-310.
- Ahmed, Z., Wang, Y., Cheng, Q., Imran, M., 2010, *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, from production to their application: An overview, *African Journal of Biotechnology*, 9(20).
- Alghoribi, M. F., Gibreel, T. M., Dodgson, A. R., Beatson, S. A., Upton, M. 2014, *Galleria mellonella* infection model demonstrates high lethality of ST69 and ST127 uropathogenic *E. coli*. *PloS one*, 9(7), e101547.
- Akkaya, Ü., Beyaz, E.K., 2018, Nörolojik Hastalıklar ve Probiyotik-Prebiyotik Kullanımı, *Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi-BÜSBİD*, 2(2): 01-29.
- Akyol E., 2013, Mum Güvesi (*Galleria mellonella* L.) Zararı ve Kontrol Yöntemleri, *Arıcılık Araştırma Dergisi*, 2-7.
- Al-Malkey, M.K., Ismeel, M.C., Al-Hur, F.J.A., Mohammed, S. W., Nayyef, H.J., 2017, Antimicrobial effect of probiotic *Lactobacillus spp.* on *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Contemporary Medical Sciences*, 3(10): 218-223.
- Alp, D., Ertürkmen, P., 2019, Probiyotik olarak kullanılan *Lactobacillus spp.* suşlarının kolesterol düşürücü etkileri ve olası mekanizmalar, *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(1): 108-113.
- Alvandian, A., Jawadi, M. H., Altıntaş, Z. N., Yıldız, N., & Karaman, M. 2016, *Candida albicans'* in Salgısal Asit Proteinaz Etkinliğinin Araştırılmasında *In Vivo* Model Olarak *Galleria mellonella* Larvanın Kullanılması.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Andersson, R., 1988, Food processing. Lactic acid bacteria in the production of food, Food Laboratory Newsletter, (14): 17-21.
- Alp, D., Kuleaşan, H. 2019, Farklı Kaynaklardan İzole Edilmiş Laktik Asit Bakterilerinin Ekzopolisakkarit Üretimi ve Kolesterol Asimilasyon Yeteneklerinin Belirlenmesi. Gıda, 44(2), 191-201.
- Axelsson, L.T., 1993, Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. In ‘‘ Lactic Acid Bacteria’’, Ed: Salmina, S., Wright, A.V., Marcel Dekker Inc., USA, 1-63.
- Bajaj, BK, Claes, IJ ve Lebeer, S. 2020, Probiyotiklerin fonksiyonel mekanizmaları. Mikrobiyoloji, biyoteknoloji ve gıda bilimleri dergisi , 2020 , 321-327.
- Bakshi, A., Stephen, S., Borum, M.L. and Doman, D.B. 2010, Emerging Therapeutic Options for Celiac Disease: Potential Alternatives to a Gluten-Free Diet. Gastroenterology & Hepatology 8:582-588.
- Barreiro, L.C., Eixarch, H., Montalban, X., Espejo, C., 2018, Combined therapies to treat complex diseases: The role of the gut microbiota in multiple sclerosis, Autoimmunity Reviews, 17(2): 165-174.
- Bartkiene, E., Lele, V., Ruzauskas, M., Domig, K. J., Starkute, V., Zavistanaviciute, P., ... & Mickiene, R. 2020, Lactic acid bacteria isolation from spontaneous sourdough and their characterization including antimicrobial and antifungal properties evaluation. Microorganisms, 8(1), 64.
- Başığit, G., Karahan, A. G., & Kılıç, B. 2007, Fermente et ürünlerinde fonksiyonel starter kültürler ve probiyotikler. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 64(2), 60-69.
- Beeton, M. L., Alves, D. R., Enright, M. C., Jenkins, A. T. A. 2015, Assessing phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* using a *Galleria mellonella* infection model. International journal of antimicrobial agents, 46(2), 196-200.
- Berger, M., Sarantopoulos, C., Ongchangco, D., Sry, J., ve Cesario, T. 2015, Rapid isolation of gluten-digesting bacteria from human stool and saliva by using gliadin-containing plates. Experimental Biology and Medicine, 240(7), 917-924.
- Berríos, P., Fuentes, J. A., Salas, D., Carreño, A., Aldea, P., Fernández, F., Trombert, A. N. 2018, Inhibitory effect of biofilm-forming *Lactobacillus kunkeei* strains against virulent *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in honeycomb moth (*Galleria mellonella*) infection model. Beneficial microbes, 9(2), 257-268.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Beveridge, T. J. 2001, Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic & Histochemistry*, 76(3), 111-118.
- Bhola, J., Bhadekar, R., 2019, Invitro synergistic activity of lactic acid bacteria against multi-drug resistant staphylococci, *BMC complementary and alternative medicine*, 19(1): 70.
- Biesiekierski, J. R. 2017, What is gluten?. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 32, 78-81.
- Bilgin, H., 2008, Fermente süt ürününden izole edilen bakteriyosinogenik bir bakterinin antimikrobiyal aktivitesi, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 53 s.
- Bilginer, H., Çetin, B., 2019, Probiyotikler ve Belirlenmelerinde Kullanılan in vitro Testler, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 50(3): 312-325.
- Bronskill, J. 1961, A cage to simplify the rearing of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Pyrallidae). *J. Lep. Soc.*, 15(2), 102-104
- Campana, R., van Hemert, S., ve Baffone, W. 2017, Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathogens*, 9(1), 1-12.
- Caminero A, Galipeau HJ, McCarville JL, Johnston CW, Bernier SP, Russell AK, et al. 2016, Duodenal bacteria from patients with celiac disease and healthy subjects distinctly affect gluten breakdown and immunogenicity. *Gastroenterology* 151(4):670–83.
- Ceyhan, N., Alıç, H. 2012, Bağırsak mikroflorası ve probiyotikler. *Turkish Journal of Scientific Reviews*, 5(1), 107-113.
- Chander AM, Yadav H, Jain S, Bhadada SK, Dhawan DK 2018, Cross-talk between gluten, intestinal microbiota and intestinal mucosa in celiac disease: recent advances and basis of autoimmunity. *Front Microbiol* 9:2597. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02597>
- Charriere J.D., Imdorf A., 1997, Protection of Honeycombs From Moth Damage, Swiss Bee Research Center Federal Dairy Research Station, Communication, 16.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. and Chikindas, M.L., 2001, Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation, *Int. J. Food Microbiol.* 71, 1-20.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Coqueiro, A. Y., Bonvini, A., Tirapegui, J., & Rogero, M. M. 2017, Probiotics Supplementation As An Alternative Method For Celiac Disease Treatment. *International Journal Of Probiotics & Prebiotics*, 12(1).
- Cristofori, F., Francavilla, R., Capobianco, D., Dargenio, V. N., Filardo, S., & Mastromarino, P. 2020, Bacterial-Based Strategies to Hydrolyze Gluten Peptides and Protect Intestinal Mucosa. *Frontiers in Immunology*, 11, 2724.
- Çakır, D. ve Çakmakçı, M.L., 2004, Probiyotikler:Tanımı, Etki Mekanizması, Seçim ve Güvenilirlik Kriterleri, *Gıda Teknolojisi Derneği*, 29(6), 427-434s.
- Çakır, E., 2019, Zebularin'in *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)'nın Antioksidan Enzimlerine Etkisi
- Çağlar Y., Tutkun E., Tutar A. Yılmaz B., 2001, Bal mumu Güvesi Mücadelesinde Kullanılan Kükürtdioksitin (SO₂) Farklı Dozlarının Kimyasal Etkisi Üzerine Araştırmalar, *Tek. Arıcılık Dergisi*, 55-58.
- Çifci, M. M., 2017, Ekşi hamur mayasından izole edilen *Lactobacillus* türlerinin klasik ve moleküler yöntemlerle tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 34-69.
- Çon, A.H., Gökalp, H.Y., 2000, Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Metabolitleri ve Etki şekilleri, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 30: 180-190.
- Dallal, M.S., Zamaniahari, S., Davoodabadi, A., Hosseini, M., Rajabi, Z., 2017, Identification and characterization of probiotic lactic acid bacteria isolated from traditional persian pickled vegetables, *GMS Hygiene and Infection Control*, 12.
- D'ariento, R., Stefanile, R., Maurano, F., Mazzarella, G., Ricca, E., Troncone, R., ... & Rossi, M. 2011, Immunomodulatory effects of *Lactobacillus casei* administration in a mouse model of gliadin-sensitive enteropathy. *Scandinavian journal of immunology*, 74(4), 335-341.
- Demirçeken, F.G., 2011, Gluten enteropatisi (çölyak hastalığı): Klasik bir öykü ve güncel gelişmeler, *Güncel Gastroenteroloji*, 15(1): 58-72.
- Demirok, N. T., ve Alpaslan, M. 2017, Ticari Starter Kültür Kullanılmamış Fermente Süt Ürünlerinden İzole Edilen *Lactobacillus* spp.'nin Fenotipik ve Moleküler İdentifikasyonu ile Bu Bakterilerin Probiyotik Özelliklerinin İnvitro Koşullarda Araştırılması.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- de Sousa Moraes, L. F., Grzeskowiak, L. M., de Sales Teixeira, T. F., & Peluzio, M. D. C. G. 2014, Intestinal microbiota and probiotics in celiac disease. *Clinical microbiology reviews*, 27(3), 482-489.
- Di Cerbo, A., Palmieri, B., Aponte, M., Morales-Medina, J.C., Iannitti, T., 2016, Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli. *Journal of Clinical Pathology*, 69(3): 187-203.
- Di Cagno R, De Angelis M, Auricchio S, Greco L, Clarke C, De Vincenzi M, et al. 2004, Sourdough bread made from wheat and nontoxic flours and started with selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue patients. *Appl Environ Microbiol* 70:1088–96.
- Dinçer, B., Durmaz, M., Adıgüzel, A., 2019, *Anoxybacillus thermarum* A4 Suşundaki Katalaz Aktivitesinin İncelenmesi ve Tam Hücre İmmobilizasyonu, *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 4(3): 581-588.
- Dinçer, E., Kıvanç, M., Karaca, H., 2009, Biyokoruyucu olarak laktik asit bakterileri ve bakteriyosinler, *Gıda*, 35: 55-62.
- Duar, R. M., Clark, K. J., Patil, P. B., Hernández, C., Brüning, S., Burkey, T. E., ... & Walter, J. 2015, Identification and characterization of intestinal lactobacilli strains capable of degrading immunotoxic peptides present in gluten. *Journal of applied microbiology*, 118(2), 515-527.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F., Collins, J.K., 2001, In Vitro Selection Criteria for Probiotic Bacteria of Human Origin: Correlation with In Vivo Findings. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73: 386S-92S.
- Dlamini, Z.C., Langa, R.L., Aiyegoro, O.A., Okoh, A.I., 2019, Safety evaluation and colonisation abilities of four lactic acid bacteria as future probiotics, *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11(2): 397-402.
- Ekpenyong, M., Asitok, A., Odey, A., Antai, S., 2016, Production and activity kinetics of gelatinase by *Serratia sp.* SLO3, *Nigerian Journal of Biopesticides*, 1: 70-82.
- Elçioğlu, Ö. 2010, Kargı Tulum Peynir'inden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Starter ve Probiyotik Kültür Özelliklerinin Belirlenmesi, 25-87.
- Erdil, A., Ates, Y., 2005, Gluten enteropatisinde son gelişmeler, *Güncel Gastroenteroloji*, 9: 18-28.
- Ertekin, Ö. 2007, Farklı gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin nümerik taksonomisi (Master's thesis, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ertekin, Ö., Çon, A.H., 2014, Farklı gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin endüstriyel ve probiyotik özellikleri, Akademik Gıda, 12(4): 6-16.
- Ertürkmen, P., Öner, Z. 2015, Beyaz Peynir Örneklerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Başlatıcı (Starter) Kültür Özelliklerinin Biyokimyasal Yöntemlerle Belirlenmesi. Journal of Natural & Applied Sciences, 19(3).
- Evren, M., Apan, M., Tutkun, E., Evren, S., 2011, Geleneksel fermente gıdalarda bulunan laktik asit bakterileri. II. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, 27-29.
- Coqueiro, A. Y., Bonvini, A., Tirapegui, J., & Rogero, M. M. 2017, Probiotics Supplementation As An Alternative Method For Celiac Disease Treatment. International Journal Of Probiotics & Prebiotics, 12(1).
- Cristofori, F., Francavilla, R., Capobianco, D., Dargenio, V. N., Filardo, S., & Mastromarino, P. 2020, Bacterial-Based Strategies to Hydrolyze Gluten Peptides and Protect Intestinal Mucosa. Frontiers in Immunology, 11, 2724.
- Çakır, D. ve Çakmakçı, M.L., 2004, Probiyotikler:Tanımı, Etki Mekanizması, Seçim ve Güvenilirlik Kriterleri, Gıda Teknolojisi Derneği, 29(6), 427-434s.
- Çakır, E., 2019, Zebularin'in *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)'nın Antioksidan Enzimlerine Etkisi
- Çağlar Y., Tutkun E., Tutar A. Yılmaz B., 2001, Bal mumu Güvesi Mücadelesinde Kullanılan Kükürtdioksitin (SO₂) Farklı Dozlarının Kimyasal Etkisi Üzerine Araştırmalar, Tek. Arıcılık Dergisi, 55-58.
- Çifci, M. M., 2017, Ekşi hamur mayasından izole edilen *Lactobacillus* türlerinin klasik ve moleküler yöntemlerle tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 34-69.
- Çon, A.H., Gökalp, H.Y., 2000, Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Metabolitleri ve Etki şekilleri, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi 30: 180-190.
- Dallal, M.S., Zamaniahari, S., Davoodabadi, A., Hosseini, M., Rajabi, Z., 2017, Identification and characterization of probiotic lactic acid bacteria isolated from traditional persian pickled vegetables, GMS Hygiene and Infection Control, 12.
- D'ariento, R., Stefanile, R., Maurano, F., Mazzarella, G., Ricca, E., Troncone, R., ... & Rossi, M. 2011, Immunomodulatory effects of Lactobacillus casei administration in a mouse model of gliadin-sensitive enteropathy. Scandinavian journal of immunology, 74(4), 335-341.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Demirçeken, F.G., 2011, Gluten enteropatisi (çölyak hastalığı): Klasik bir öykü ve güncel gelişmeler, Güncel Gastroenteroloji, 15(1): 58-72.
- Demirok, N. T., ve Alpaslan, M. 2017, Ticari Starter Kültür Kullanılmamış Fermente Süt Ürünlerinden İzole Edilen *Lactobacillus* spp.'nin Fenotipik ve Moleküler İdentifikasyonu ile Bu Bakterilerin Probiyotik Özelliklerinin İnvitro Koşullarda Araştırılması.
- de Sousa Moraes, L. F., Grzeskowiak, L. M., de Sales Teixeira, T. F., & Peluzio, M. D. C. G. 2014, Intestinal microbiota and probiotics in celiac disease. *Clinical microbiology reviews*, 27(3), 482-489.
- Di Cerbo, A., Palmieri, B., Aponte, M., Morales-Medina, J.C., Iannitti, T., 2016, Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli. *Journal of Clinical Pathology*, 69(3): 187-203.
- Di Cagno R, De Angelis M, Auricchio S, Greco L, Clarke C, De Vincenzi M, et al. 2004, Sourdough bread made from wheat and nontoxic flours and started with selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue patients. *Appl Environ Microbiol* 70:1088–96.
- Diñçer, B., Durmaz, M., Adıgüzel, A., 2019, *Anoxybacillus thermarum* A4 Suşundaki Katalaz Aktivitesinin İncelenmesi ve Tam Hücre İmmobilizasyonu, *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 4(3): 581-588.
- Diñçer, E., Kıvanç, M., Karaca, H., 2009, Biyokoruyucu olarak laktik asit bakterileri ve bakteriyosinler, *Gıda*, 35: 55-62.
- Duar, R. M., Clark, K. J., Patil, P. B., Hernández, C., Brüning, S., Burkey, T. E., ... & Walter, J. 2015, Identification and characterization of intestinal lactobacilli strains capable of degrading immunotoxic peptides present in gluten. *Journal of applied microbiology*, 118(2), 515-527.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F., Collins, J.K., 2001, In Vitro Selection Criteria for Probiotic Bacteria of Human Origin: Correlation with İn Vivo Findings. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73: 386S-92S.
- Dlamini, Z.C., Langa, R.L., Aiyegoro, O.A., Okoh, A.I., 2019, Safety evaluation and colonisation abilities of four lactic acid bacteria as future probiotics, *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11(2): 397-402.
- Ekpenyong, M., Asitok, A., Odey, A., Antai, S., 2016, Production and activity kinetics of gelatinase by *Serratia* sp. SLO3, *Nigerian Journal of Biopesticides*, 1: 70-82.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Elçioğlu, Ö. 2010, Kargı Tulum Peynir'inden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Starter ve Probiyotik Kültür Özelliklerinin Belirlenmesi, 25-87.
- Erdil, A., Ates, Y., 2005, Gluten enteropatisinde son gelişmeler, Güncel Gastroenteroloji, 9: 18-28.
- Ertekin, Ö. 2007, Farklı gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin nümerik taksonomisi (Master's thesis, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Ertekin, Ö., Çon, A.H., 2014, Farklı gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin endüstriyel ve probiyotik özellikleri, Akademik Gıda, 12(4): 6-16.
- Ertürkmen, P., Öner, Z. 2015, Beyaz Peynir Örneklerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Başlatıcı (Starter) Kültür Özelliklerinin Biyokimyasal Yöntemlerle Belirlenmesi. Journal of Natural & Applied Sciences, 19(3).
- Evren, M., Apan, M., Tutkun, E., Evren, S., 2011, Geleneksel fermente gıdalarda bulunan laktik asit bakterileri. II. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, 27-29.
- FAO/WHO, 2002, Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Guidelines for the evaluation of probiotics in foods, Report of a Joint FAO/WHO Working Group, London, Ontario, Canada, April 30 and May 1 2002.
- Fallingborg, J. 1999, İnsan gastrointestinal sisteminin intralüminal pH'ı. Danimarka tıp bülteni , 46 (3), 183.
- Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A., Poznanski, E., 2009, Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk, International dairy journal, 19(1): 3-11.
- Fernández, M.F., Boris, S., Barbès, C., 2003, Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract, Journal of Applied Mikrobiology, 94; 449-455.
- Fortina, M.G., Ricci, G., Borgo, F., Manachini, P.L., Arends, K., Schiwon, K., Abajy, M.Y., Grohmann, E., 2008, A Survey on Biotechnological Potential and Safety of the Novel Enterococcus species of Dairy Origin, E. Italicus. International Journal of Food Microbiology, 123, 204-211.
- Fugelsang, K.C., & Edward, C.G. 2007, Lactic Acid Bacteria. In Wine Microbiology Practical Applications and Procedures. (2nd ed., Vol. 2, pp.29-44). New York: Springer
- Gan, Y., Su, S., Li, B., Fang, C., 2019, Efficacy of Probiotics and Prebiotics in Prevention of Infectious Complications Following Hepatic Resections: Systematic Review and Meta-Analysis, Journal of Gastrointestinal & Liver Diseases, 28(2): 205-211.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gerez, C.L., Rollan, G.C., De Valdez, G.F., 2006, Gluten breakdown by *lactobacilli* and *pediococci* strains isolated from sourdough. Letters in Applied Microbiology, 42(5); 459-464.
- Gillor, O., Etzion, A., Riley, M.A., 2008, The dual role of bacteriocins as anti-and probiotics, Applied Microbiology and Biotechnology, 81(4): 591-606.
- Gimenez-Bastida, J.A., Piskula, M., Zieliński, H., 2015, Recent advances in development of gluten-free buckwheat products, Trends in Food Science & Technology, 44(1): 58-65.
- Giorgi A, Cerrone R, Capobianco D, Filardo S, Mancini P, Zanni F, et al. 2020, A Probiotic Preparation Hydrolyzes Gliadin and Protects Intestinal Cells from the Toxicity of Pro-Inflammatory Peptides. Nutrients 12:495.
- Gobbetti, M., Rizzello, C.G., Di Cagno, R., De Angelis, M., 2007, Sourdough lactobacilli and celiac disease, Food Microbiology, 24: 187-196.
- Gülbandılar, A., Okur M., Dönmez, M., 2017, Fonksiyonel gıda olarak kullanılan probiyotikler ve özellikleri, Turkish Journal of Scientific Reviews, 10(1): 44-47.
- Gültekin, M., 2004, Probiyotikler, Ankem Dergisi, 18 (Ek 2): 87-89.
- Güre, S., 2009, Ekşihamurlardan izole edilen laktik asit bakterilerinin gluten üzerine proteolitik etkilerinin incelenmesi, Doktora Tezi, SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Gürsoy, O. ve Kınık, Ö., 2005, Laktobasiller ve Probiyotik Peynir Üretiminde Kullanım Potansiyelleri, Pamukkale Üniv. Mühendislik Bilimleri Derg., 11(3), 361-371s.
- Greco, L., Gobbetti, M., Auricchio, R., DiMase, R., Landolfo, F., Paparo, F., Di Cagno, R., De Angelis, M., Rizzello, C.G. and Cassone, A. 2011, Safety for patients with celiac disease of baked goods made of wheat flour hydrolysed during food processing. Clinical Gastroenterology and Hepatology 9:24-29.
- Halbmayr-Jech, E., Hammer, E., Fielder, R., Coutts, J., Rogers, A., & Cornish, M. (2012). Characterization of G12 sandwich ELISA, a next-generation immunoassay for gluten toxicity. Journal of AOAC International, 95(2), 372-376.
- Hawrelak J 2003, Probiotics: choosing the right one for your needs. J Aust Tradit-Med So 9(2):67-75.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- İşleroğlu, H., Yıldırım, Z. Yıldırım, M. 2008, Yöresel peynirden antimikrobiyal aktiviteye sahip laktik asit bakterisinin izolasyonu ve tanısı. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 2008(1), 1-6.
- Jain, A., Jain, R., Jain, S., 2020, Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology. Springer.
- Kalkan, S., 2016, Probiyotik laktik asit bakterilerinin *Staphylococcus aureus*'a karşı antimikrobiyel etkilerinin farklı matematiksel modeller ile analizi, Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 1(2): 150-159
- Karaman, R., Jubeh, B. ve Breijyeh, Z. 2020, Gram pozitif bakterilerin mevcut antibakteriyel ajanlara direnci ve üstesinden gelinen yaklaşımlar. Moleküller , 25 (12), 2888.
- Kay, S., Edwards, J., Brown, J., Dixon, R. A., 2019, *Galleria mellonella* infection model identifies both high and low lethality of *Clostridium perfringens* toxigenic strains and their response to antimicrobials. Frontiers in microbiology, 10, 1281.
- Kazancıgil, E. 2018, Çeşitli tulum peynirlerinden izole edilmiş laktik asit bakterilerinin bazı teknolojik özelliklerinin belirlenmesi (Doctoral dissertation, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü), 11-45.
- Köse, S., 2019, Zebularinin Konak *Galleria mellonella* ve Endoparazitoid *Pimpla turionellea*'nın Yaşam Döngüsü İle Konak Hemositlerine Etkileri, 31-79.
- Kırma, İ., 2016, Gıda Kaynaklı Laktik Asit Bakterileri Kullanılarak Ekzopolisakkarit Üretimi, Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kumar M, Kisson-Singh V, Coria AL, Moreau F, Chadee K. 2017, Probiotic mixture VSL#3 reduces colonic inflammation and improves intestinal barrier function in Muc2 mucin deficient mice. American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology, 312, 34-45.
- Kitahara, M., Sakata, S., Benno, Y. 2005, Biodiversity of *Lactobacillus sanfranciscensis* isolated from five sourdoughs. Letters in Applied Microbiology, 40, 353-357.
- Klingberg, T. D., Axelsson, L., Naterstad, K., Elsser, D., & Budde, B. B. 2005, Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages. International Journal of Food Microbiology, 105(3), 419-431.
- Lavermicocca, P., Dekker, M., Russo, F., Valerio, F., Di Venere, D., Sisto, A., 2015, *Lactobacillus paracasei*-enriched vegetables containing health promoting molecules, In Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion, pp. 361-370.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Li, Q., Liu, X., Dong, M., Zhou, J., Wang, Y., 2015, Aggregation and Adhesion Abilities of 18 Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Traditional Fermented Food. *International Journal of Agricultural Policy and Research*, 3 (2), 84-92.
- Lukic, J., Chen, V., Strahinic, I., Begovic, J., Lev-Tov, H., Davis, S.C., Tomic-Canc, M., Pastar, I., 2017, Probiotics or pro-healers: the role of beneficial bacteria in tissue repair, *Wound Repair and Regeneration*, 25(6): 912-922.
- Lynch, K.M., Coffey, A., Arendt, E.K., 2018, Exopolysaccharide producing lactic acid bacteria: Their techno-functional role and potential application in gluten-free bread products, *Food research international*, 110: 52-61.
- Manini, F., Casiraghi, M. C., Poutanen, K., Brasca, M., Erba, D., & Plumed-Ferrer, C. 2016, Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. *LWT-food Science and Technology*, 66, 275-283.
- Manohar, P., Nachimuthu, R., & Lopes, B. S., 2018. The therapeutic potential of bacteriophages targeting gram-negative bacteria using *Galleria mellonella* infection model. *BMC microbiology*, 18(1), 97.
- M'hir, S., Aldric, J.M., El-Mejdoub, T., Destain, J., Mejri, M., Hamdi, M., Thonart, P., 2008, Proteolytic breakdown of gliadin by *Enterococcus faecalis* isolated from Tunisian fermented dough, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(12): 2775-2781.
- Mancuso, C., Santangelo, R., 2017, Alzheimer's disease and gut microbiota modifications: The long way between preclinical studies and clinical evidence, *Pharmacological Research*, 129: 329-336.
- Mickowska, B., Socha, P., & Urminska, D. (2016). Immunochemical evaluation of proteolysis of cereal proteins causing celiac disease by microbial proteases. *Food and agricultural immunology*, 27(6), 743-757.
- Mills S, Ross RP, Coffey A., 2011, Lactic acid bacteria *Lactococcus lactis*. *Encyclopedia of Dairy Sciences* 2: 132-137.
- Nakatsuji T, Chen TH, Narala S, Chun KA, et al. 2017, Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *S. aureus* and are deficient in atopic dermatitis. *Science Translational Medicine*. 9, 4680.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nale, J. Y., Chutia, M., Carr, P., Hickenbotham, P. T., & Clokie, M. R. 2016, 'Get in early'; biofilm and wax moth (*Galleria mellonella*) models reveal new insights into the therapeutic potential of *Clostridium difficile* bacteriophages. *Frontiers in microbiology*, 7, 1383.
- Nes, I.F., Yoon, S-S. and Diep, D.B., 2007, Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review, *Food Sci. Biotechnol.* 16, 675-690.
- Olveira G, Molero I. 2016, An update on probiotics, prebiotics and symbiotics in clinical nutrition. *Endocrinología y Nutrición (English Edition)* 63(9), 482-494.
- Ouwehand, A.C., Tuomola, E.M., Tölkö, S., Salminen, S., 2001, Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus, *International Journal of Food Microbiology.* 64:119-126.
- Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. 2013, Probiotics: an overview of beneficial effects. *Current Opinion in Biotechnology.* 82, 89.
- Öksüz, L. 2017, Anaerob Bakterileri Saklama Yöntemleri.
- Padmavathi, T., Bhargavi, R., Priyanka, P. R., Niranjana, N. R., & Pavitra, P. V. 2018, Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its partial purification. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 357-362.
- Prince T, McBain AJ, O'Neill CA. 2012, *Lactobacillus reuteri* protects epidermal keratinocytes from *S. aureus*-induced cell death by competitive exclusion. *Applied and Environmental Microbiology* , 78(15), 26-5119.
- Rahmati, F., 2017, Characterization of *Lactobacillus*, *Bacillus* and *Saccharomyces* isolated from Iranian traditional dairy products for potential sources of starter cultures, *AIMS microbiology*, 3(4): 815.
- Ramarao, N., Nielsen-Leroux, C., Lereclus, D. 2012, The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (70), e4392.
- Ramos AN, Sesto Cabral ME, Noseda D, Bosch A, Yantorno OM, Valdez JC. 2012, Antipathogenic properties of *Lactobacillus plantarum* on *P. aeruginosa*: The potential use of its supernatants in the treatment of infected chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 20(4), 552-562.
- Reiner, K., 2010, Catalase test protocol. American Society for Microbiology Microbe Library.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rokana, N., Singh, B.P., Thakur, N., Sharma, C., Gulhane, R.D., Panwar, H., 2018, Screening of cell surface properties of potential probiotic lactobacilli isolated from human milk, *Journal of Dairy Research*, 85(3): 347-354.
- Rollan, G., De Angelis, M., Gobbetti, M., De Valdez, G.F., 2005, Proteolytic activity and reduction of gliadin-like fractions by sourdough lactobacilli, *Journal of applied microbiology*, 99(6): 1495-1502.
- Rosenberg, M., Gutnick, D., Rosenberg, E., 1980, Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity, *FEMS microbiology letters*, 9(1):29-33.
- Russell WMS, Burch RL: *The Principles of Humane Experimental Technique*, 1959, http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/chap4d, Erişim Tarihi: 18.12.2020.
- Sáez, G. D., Saavedra, L., Hebert, E. M., & Zárata, G. 2018, Identification and biotechnological characterization of lactic acid bacteria isolated from chickpea sourdough in northwestern Argentina. *LWT*, 93, 249-256.
- Sak, O., Uçkan, F., & Ergin, E. 2006, Effects of cypermethrin on total body weight, glycogen, protein, and lipid contents of *Pimpla turionellae* (L)(Hymenoptera: Ichneumonidae).
- Sakandar, H. A., Usman, K., & Imran, M. (2018). Isolation and characterization of gluten-degrading *Enterococcus mundtii* and *Wickerhamomyces anomalus*, potential probiotic strains from indigenously fermented sourdough (Khamir). *LWT*, 91, 271-277.
- Sağdıç, O., Küçüköner, E., Özçelik, S., 2004, Probiyotik ve prebiyotiklerin fonksiyonel özellikleri, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35 (3-4): 221-228.
- Salminen S, Gueimonde M, 2004, Human studies on probiotics: what is scientifically proven. *J Food Sci* 69(5):M137–M140. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb10723>.
- Salomskiene, J., Jonkuvienė, D., Macioniene, I., Abraitienė, A., Zeime, J., Repeckienė, J. ve Vaiciulyte-Funk, L. 2019, Laktik asit bakterileri tarafından üretilen antimikrobiyal bileşiklerin oluşumu ve verimliliğindeki farklılıklar. *Avrupa Gıda Araştırma ve Teknolojisi*, 245 (3), 569-579.
- Sanchez E, Laparra JM, Sanz Y. 2012, Discerning the role of *Bacteroides fragilis* in celiac disease pathogenesis. *Appl Environ Microbiol* 78:6507–15.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Seed, K. D., ve Dennis, J. J. 2008, Development of *Galleria mellonella* as an alternative infection model for the Burkholderia cepacia complex. Infection and immunity, 76(3), 1267-1275.
- Shape, M.E., Fryer, T.F., Smith, D.G., 1966, Identification of the Lactic Acid Bacteria. "Gibbs, MM and Skinner, FA (ed): Identification Methods for Microbiologist" Part A, Academic Pres, New York, s, 245.
- Sharma, K., Bhawanani, S., ve Goel, G. 2018, Evaluation of Indigenous Probiotic Lactic Acid Bacteria to Overcome Gluten Induced Celiac Disease.
- Sharma, K., Attri, S., Goel, G. 2019, Selection and evaluation of probiotic and functional characteristics of autochthonous lactic acid bacteria isolated from fermented wheat flour dough babroo. Probiotics and antimicrobial proteins, 11(3), 774-784.
- Shewry, P. R. (2019). What is gluten-why is it special?. Frontiers in Nutrition, 6, 101.
- Shokryazdan, P., Sieo, C.C., Kalavathy, R., Liang, J.B., Alitheen, N.B., Faseleh Jahromi, M., Ho, Y.W., 2014, Probiotic potential of Lactobacillus strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains, BioMed Research International, 2014.
- Slavica, A., Trontel, A., Jelovac, N., Kosovec, Ž., Šantek, B., Novak, S., 2015, Production of lactate and acetate by *Lactobacillus coryniformis* subsp. torquens DSM 20004T in comparison with *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531T, Journal of biotechnology, 202: 50-59.
- Sourabh, A., Kanwar A. S. S., Sharma, O. M. 2011, Journal of Yeast and Fungal Research: Screening of Indigenous Yeast Isolates Obtained from Traditional Fermented Foods of Western Himalayas for Probiotic Attributes, 2(8), 117-126.
- Strompfova, V., Laukova, A., Ouwehand, A. C., 2004, Selection of Enterococci for Potential Canine Probiotic Additives. Veterinary Microbiology, 100, 107- 114.
- Syal, P., Vohra, A. 2013, International Journal of Microbiology Research: Probiotic Potential of Yeasts Isolated From Traditional Indian Fermented Foods, 5 390-398.
- Sjögren J, Magnusson J, Broberg A, Schnürer J, Kenne L 2003, Antifungal 3-hydroxy fatty acids from Lactobacillus plantarum MiLAB. J Appl Microbiol 69:7554–7557
- Topçu, K. C., Kaya, M., & Kaban, G. 2020, Probiotic properties of lactic acid bacteria strains isolated from pastırma. LWT, 134, 110216.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tsai, C. J. Y., Loh, J. M. S., Proft, T., 2016. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*, 7(3), 214-229.
- Tuo, Y., Yu, H., Ai, L., Wu, Z., Guo, B., Chen, W., 2013, Aggregation and Adhesion Properties of 22 *Lactobacillus* strains. *Journal of Dairy Science*, 96(7), 4252- 4257.
- Türksoy, S., Özkaya, B., 2006, Gluten ve Çölyak hastalığı., *Türkiye*, 9: 24-26.
- Ulusoy, M., Feyizoglu, H., Turan, M., Yılmaz, M., Yigit, N., Gürkan, Y., Kuyubası, Z., 2002, Gluten sensitif enteropati, *Güncel Gastroenteroloji*, 6/3: 151-158.
- Ün, C., Aydogdu, S., 2003, Çölyak hastalığının moleküler genetik temelleri, *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 46: 75-79.
- Valerio F, Lavemicocca P, Pascale M, Visconti A 2004, Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. *FEMS Microbiol Lett* 23:289–295.
- Vilela, S.F., Barbosa, J.O., Rossoni, R.D., Santos, J.D., Prata, M.C., Anbinder, A.L., Jorge, A.O. Junqueira, J.C., 2015, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 inhibits biofilm formation by *C. albicans* and attenuates the experimental candidiasis in *Galleria mellonella*, *Virulence*, 6(1): 29-39.
- Vinderola, C.G., Reinheimer, J.A., 2003, Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance, *Food Research International*, 36(9-10): 895-904.
- Yiğit, A., Sinmez, Ç. Ç., Aslım, G. 2015, Türkiye’de deney hayvanı kullanmaya yetkili kişilerin hayvan kullanımına yönelik tutumları. *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 21(6), 885-892.
- Yüksekdağ, Z. N., Beyatlı, Y. 2003, Kefir mikroflorası ile laktik asit bakterilerinin metabolik, antimikrobiyal ve genetik özellikleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(2), 49-69.
- Wand, M. E., McCowen, J. W., Nugent, P. G., & Sutton, J. M., 2013. Complex interactions of *Klebsiella pneumoniae* with the host immune system in a *Galleria mellonella* infection model. *Journal of medical microbiology*, 62(12), 1790-1798.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang Y, Kirpich I, Liu Y, Ma Z, Barve S, McClain CJ. 2011, *Lactobacillus rhamnosus* GG treatment potentiates intestinal hypoxia-inducible factor, promotes intestinal integrity and ameliorates alcohol-induced liver injury. *American Journal of Pathology*, 179(6), 75.
- Wehrle, K., Crowe, N., van Boeijen, I., Arendt, E. K., 1999, Screening methods for the proteolytic breakdown of gluten by lactic acid bacteria and enzyme preparations, *European Food Research and Technology*, 209(6): 428-433.
- Welman AD, Maddox IS. 2003, Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*, 21, 269–274.
- Wieland CW, Siegmund B, Senaldi G, Vasil ML, Dinarello CA, Fantuzzi G. 2002, Pulmonary inflammation induced by *P. aeruginosa* lipopolysaccharide, phospholipase C, and exotoxin A: role of interferon regulatory factor 1. *Infection Immunology*. 70, 1352-1358.
- Xu, Y., Zhou, T., Tang, H., Li, X., Chen, Y., Zhang, L., & Zhang, J. 2020, Probiotic potential and amylolytic properties of lactic acid bacteria isolated from Chinese fermented cereal foods. *Food Control*, 111, 107057.