

**KOLOSTRUMDAN ELDE EDİLMİŞ LİYOFİLİZE
POSTBİYOTİKLERİN SİTOTOKSİK VE
APOPTOTİK ETKİLERİ**

Yüksek Lisans Tezi

Hacer AKDAĞ

Eskişehir 2023

**KOLOSTRUMDAN ELDE EDİLMİŞ LİYOFİLİZE POSTBİYOTİKLERİN
SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİ**

Hacer AKDAĞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Şubat 2023

ÖZET

KOLOSTRUMDAN ELDE EDİLMİŞ LİYOFİLİZE POSTBİYOTİKLERİN SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİ

Hacer AKDAĞ

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Şubat 2023

Danışman: Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK

Mikrobiyotada meydana gelen disbiyoz sonucunda ortaya çıkan önemli sağlık sorunlarından biride kanserdir. Kolorektal kanser, dünya çapında her yıl tahmini 1.000.000 yeni vaka ve gelişmiş dünyada yaklaşık %33'lük önemli bir ölüm oranı ile kanser insidansının üçüncü önde gelen nedenidir. Sığır kolostrumu (SK), antikanser etki gösterme potansiyelinden ötürü araştırmacıların gün geçtikçe ilgisini çekmeye başlamıştır. SK, güçlü antioksidan, antiinflamatuvar, anti-kanser ve anti-mikrobiyal özelliklere sahip bir glikoprotein olan laktoferrin açısından zengindir. Kolostrum probiyotik özellikli bakteriler açısından da fazlaca çeşitlilik içermektedir. Bu tez kapsamında; 21 gün fermente edilmiş kolostrumdan izole edilmiş laktik asit bakterilerinin, klasik ve moleküler yöntemlerle tanımlanması, otoagregasyon ve koagregasyon, biyofilm oluşturma, antibiyotik duyarlılıkları, antimikrobiyal aktivite, laktik asit üretimi, hemolitik aktiviteleri, pH, tuz, safra tuzu ve asit dirençleri belirlenmiştir. Caco-2 hücre hattı üzerinde MTT yöntemi ile sitotoksik ve Anneksin V-PI yöntemi ile de apoptotik etkileri ise liyofilize postbiyotikler kullanılarak araştırılmıştır. Biyolojik aktivite açısından öne çıkan beş tür *Lactocaseibacillus rhamnosus* olarak tanımlanmıştır. IC₅₀ değerleri 8.657- 15.520 mg/mL arasında bulunmuştur. Akış sitometride yapılan çalışmalarda ise; liyofilize postbiyotiklerin geç apoptozise neden olduğu bulunmuştur. Postbiyotiklerin, probiyotiklere kıyasla canlı mikroorganizma içermemesi, çözünebilir bakteri metabolitlerini içermesi, saklama koşulları, dayanıklılık gibi üstün özelliklere sahip olması gelecekte gıda, kozmetik ve takviyeler açısından sağlık yararına kullanılma potansiyelini ortaya koymaktadır.

Anahtar Sözcükler: Kolorektal kanser, kolostrum, probiyotik, akış sitometri.

ABSTRACT

CYTOXIC AND APOPTOTIC EFFECTS OF LYOPHYLIZED POSTBIOTICS FROM COLOSTRUM

Hacer AKDAĞ

Department of Pharmaceutical Microbiology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, February 2023

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Zerrin CANTÜRK

Cancer is one of the important health problems that occur as a result of dysbiosis in the microbiota. Colorectal cancer is the third leading cause of cancer incidence, with an estimated 1,000,000 new cases worldwide each year and a significant death rate of approximately 33% in the developed world. Bovine colostrum (SK) has begun to attract the attention of researchers day by day due to its anticancer potential. SK is rich in lactoferrin, a glycoprotein with powerful antioxidant, anti-inflammatory, anti-cancer and anti-microbial properties. Colostrum also contains a wide variety of probiotic bacteria. Within the scope of this thesis; Identification, autoaggregation and coaggregation, biofilm formation, antibiotic susceptibility, antimicrobial activity, lactic acid production, hemolytic activities, pH, salt, bile salt and acid resistance of lactic acid bacteria isolated from colostrum fermented for 21 days were determined by classical and molecular methods. On the Caco-2 cell line, cytotoxic effects with MTT method and apoptotic effects with Annexin V-PI method were investigated using lyophilized postbiotics. Five species that stand out in terms of biological activity have been identified as *Lacticaseibacillus rhamnosus*. IC50 values were found to be between 8.657 and 15.520 mg/mL. In the studies performed in flow cytometry; lyophilized postbiotics have been found to cause late apoptosis. The fact that postbiotics do not contain live microorganisms compared to probiotics, contain soluble bacterial metabolites, have superior properties such as storage conditions and durability, reveals the potential to be used for health benefits in terms of food, cosmetics and supplements in the future.

Keywords: Colorectal cancer, colostrum, probiotic, flow cytometry.

TEŞEKKÜR

Başta bilgi birikimi ve tecrübeleri ile her daim yanımda olan; sevgisini ve desteğini benden esirgemeyen danıŐmanım sevgili Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK'e;

Bütün bilgi ve imkânları ile bana destek olan hocam Prof. Dr. MiriŐ DİKMEN'e;

Deney çalışmaları sırasında destekleri ve pozitif enerjileri ile yanımda olan hocam ArŐ. Gör. Mustafa Güçlü ÖZARDA ve Murat KAYA' ya, arkadaşlarım Melis HACIOğLU, Aygün MUSTAFAZADE ve Tuğçe KOLAÇ'a;

Mesafelere rağmen hep yanımda olan dostlarım Melisa TÜMKAYA, Arzu ERDEM ve Ramazan ÖZKAN'a;

Enerjisi ve pozitifliğiyle beni motive eden ve her daim yanımda olan canım ablam Fatma AKDAĞ'a;

Maddi ve manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen babam Adem AKDAĞ ve annem AyŐe AKDAĞ'a;

Attığım her adımda kendisinden izler taşıyacağım güzel insan eniŐtem Selahattin ARSLAN'a ve tüm sevdiklerime sonsuz teşekkür ederim.

02.02.2023

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

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

Hacer AKDAĞ

İmza

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGE DİZİNİ	ix
GÖRSELLER DİZİNİ	xiii
SİMGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Kolostrum	4
2.1.1. Kolostrum bileşenleri	4
2.1.2. Kolostrum bakteri içeriği.....	6
2.2. Probiyotikler	9
2.2.1. Probiyotiklerin genel özellikleri	9
2.2.2. İnsan sağlığı üzerinde probiyotiklerin etkileri ve bağırsak mikrobiyotası	11
2.2.3. Probiyotikler ve kanserde kullanımı	12
2.2.4. Probiyotikten postbiyotiğe geçiş.....	13
2.2.4.1. Günümüzde kullanılan bazı parabiyoitik-postbiyotikler.....	14
2.3. Laktik Asit Bakterileri.....	14
2.3.1. LAB'ların genel özellikleri.....	15
2.3.2. LAB'ların sınıflandırması.....	16
2.3.3. <i>Laktobasillus</i> cinsi bakterilerin genel özellikleri.....	19
2.4. Kolostrum, laktik asit bakterileri ve probiyotiklerin kısa tarihçesi	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM	23
3.1. Materyal	23
3.1.1. Kolostrum örneklerinin alınması ve laboratuvara getirilmesi.....	23

3.1.2. Hücre hattı	23
3.1.3. Standart bakteri suşları	23
3.1.4. Besi ortamları.....	24
3.1.4.1. MRS broth (Lactobacillus Agar acc. to De Man, Rogosa and Sharpe).(Biolife)	24
3.1.4.2. MRS broth %6 tuz ilaveli	24
3.1.4.3. MRS broth %7,5 tuz ilaveli	25
3.1.4.4. MRS broth %10 tuz ilaveli	25
3.1.4.5. MRS broth %0,3 safra tuzu(Ox gall) ilaveli(Sigma, B3883).....	25
3.1.4.6. MRS broth %0,6 safra tuzu ilaveli safra tuzu (Ox gall, Sigma, B3883) ilaveli	25
3.1.4.7. pH:2, pH:3 ve pH 3,9 MRS broth ortamı	25
3.1.4.8. pH:9,6 MRS broth ortamı.....	26
3.1.4.9. MRS broth%0,25 glikoz ilaveli.....	26
3.1.4.10. MRS agar (Lactobacillus Agar acc. to De Man, Rogosa and Sharpe).....	26
3.1.4.11. Nutrient broth (LABM, Neogen).....	27
3.1.4.12. Nutrient agar	27
3.1.4.13. Mueller hinton broth (Biolife)	27
3.1.4.14. Mueller hinton agar	28
3.1.4.15. Üç Şekerli- Demir (TSI) agar.....	28
3.1.4.16. Kanlı agar	29
3.1.4.17. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan besiyeri.....	29
3.1.5. Kullanılan cihaz ve gereçler	29
3.1.6. Kullanılan malzemelerin steril edilmesi	30
3.1.7. Kullanılan çözeltiler kimyasallar ve boyalar	31
3.1.7.1. %20' lik gliserol çözeltisi.....	31
3.1.7.2. %0,9'luk fizyolojik tuzlu su	31
3.1.7.3. %3' lük hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) çözeltisi	31
3.1.7.4. 0,1 M NaOH ve 0,1 M HCl çözeltisi	31
3.1.7.5. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) çözeltisi.....	31
3.1.7.6. BHT(butilhidroksitoluen) çözeltisi.....	31

3.1.7.7. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) çözeltisi	32
3.1.7.8. Kullanılan kimyasallar ve boyalar	32
3.1.8. Kullanılan antibiyotikler.....	32
3.2. YÖNTEM.....	34
3.2.1. Kolostrum örneklerinden mikroorganizma izolasyonu.....	34
3.2.2. İzolatların tanımlanması.....	34
3.2.2.1. Katalaz Testi.....	34
3.2.2.2. Gram Boyama	35
3.2.2.3. TSI agar testi	35
3.2.2.4. Hemolitik aktivite tayini.....	36
3.2.2.5. Biyofilm oluşumu	36
3.2.3. LAB izolatlarının probiyotik özelliklerinin belirlenmesi.....	37
3.2.3.1. Asit direncinin belirlenmesi	37
3.2.3.2. Safra tuzu direncinin belirlenmesi	37
3.2.3.3. Otoagregasyon özelliklerinin belirlenmesi	37
3.2.3.4. Koagregasyon özelliklerinin belirlenmesi.....	38
3.2.3.6. Antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi.....	38
3.2.3.7. Laktik asit üretimi tayini	39
3.2.3.8. Antimikrobiyal aktivite tayini	39
3.2.3.8.1. Agar kuyucuk difüzyon metodu	40
3.2.3.8.2. Mikrobroth dilüsyon metodu.....	40
3.2.3.9. LAB postbiyotiklerinin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi.....	41
3.2.5. Hücre kültürü çalışmaları	42
3.2.5.1. Hücre kültürü çalışmaları için LAB postbiyotiklerinin hazırlanması	42
3.2.5.2. Caco-2 (Kolon adenokarsinom hücre hattı) hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması	42
3.2.5.3. Hücre sayımı.....	43
3.2.5.4. Sitotoksik aktivitenin MTT yöntemi ile belirlenmesi	43
3.2.5.5. Akış sitometride Annexin V-PI yöntemi ile apoptotik etkinin belirlenmesi.....	44
3.2.6. 16S rRNA dizi analizi ile genotipik karakterizasyonların belirlenmesi	46

4. BULGULAR VE TARTIŞMA	48
4.1. Kolostrumdan Mikroorganizma İzolasyonu	48
4.2. İzolatların Tanımlanması	50
4.2.1. Gram boyama ve katalaz testi sonuçları	49
4.2.2. İzole edilen mikroorganizmaların biyokimyasal aktivite sonuçları	51
4.2.3. İzole edilen mikroorganizmaların hemolitik aktivite sonuçları.....	54
4.2.4. Biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi	55
4.3. LAB İzolatlarının Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi	56
4.3.1. Asit direncinin belirlenmesi	56
4.3.2. Safra tuzu direncinin belirlenmesi.....	57
4.3.3. Otoagregasyon özelliklerinin belirlenmesi	58
4.3.4. Koagregasyon özelliklerinin belirlenmesi	59
4.3.5. Antibiyotik duyarlılığı testi sonuçları.....	60
4.3.6. Laktik asit üretim miktarlarının belirlenmesi.....	62
4.3.7. LAB izolatlarının antimikrobiyal aktivite sonuçları.....	63
4.3.7.1. Agar kuyucuk difüzyon metodu	63
4.3.7.2. Mikrobrot h dilüsyon metodu sonuçları.....	64
4.3.8. LAB postbiyotiklerinin DPPH ile serbest radikal süpürücü etkisinin belirlenmesi	65
4.4. Hücre Kültürü Çalışmaları	66
4.4.1. MTT yöntemi ile LAB liyofilize postbiyotiklerinin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi	67
4.4.2. AnnexinV-PI yöntemi kullanılarak akış sitometride Caco-2 hücre hattında LAB liyofilize postbiyotiklerinin apoptotik etkilerinin değerlendirilmesi	69
4.4.3. 16S rRNA Dizi Analizi ile Genotipik Karakterizasyonların Belirlenmesi.....	74
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	75
KAYNAKÇA	81
ÖZGEÇMİŞ	97

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Temel bileşen içeriği açısından kolostrum	6
Çizelge 2.2. 70 Farklı sığırdan toplanan kolostrumda bulunun bakteri taksonları ve parite farklarına göre yüzdeleri.	7
Çizelge 2.3. Kolostrum örneklerinden kültüre alınan suşlar	8
Çizelge 2.4. Laktobasil ve Bifidobakteri türlerinden probiyotik olarak kullanılanlara bazı örnekler.....	11
Çizelge 3.1. Kullanılan standart bakteri suşları	23
Çizelge 3.2. MRS broth içeriği	24
Çizelge 3.3. MRS agar içeriği	26
Çizelge 3.4. Nutrient broth içeriği	27
Çizelge 3.5. Nutrient agar içeriği.....	27
Çizelge 3.6. Mueller hinton broth içeriği	27
Çizelge 3.7. Mueller hinton agar içeriği	28
Çizelge 3.8. TSI agar içeriği.....	28
Çizelge 3.9. Caco-2 hücre hattı besiyeri içeriği.....	29
Çizelge 3.10. Caco-2 hücre hattı besiyeri malzeme ve markaları	29
Çizelge 3.11. Kullanılan gereç-cihaz ve markaları.....	29
Çizelge 3.12. Kullanılan kimyasallar, boyalar ve markaları	32
Çizelge 3.13. Kullanılan antibiyotikler ve markaları	32
Çizelge 4.1. -20°C izole edilen izolatların kod numaraları	48

Çizelge 4.2. 21 gün inkübatörde fermente edilmiş sığır kolostrumundan izole edilen izolatların kod numaraları	50
Çizelge 4.3. Kolostrumdan izole edilen mikroorganizma izolatları	50
Çizelge 4.4. Gram (+), Katalaz (-),basil bakterileri izolatlarının biyokimyasal aktivite testleri. (+): pozitif, (-): negatif, (±): belirsiz	52
Çizelge 4.5. 7 izolat ve <i>E.coli</i> 35298 ve <i>E.faecalis</i> 51299 suşlarının biyofilm oluşturma yetenekleri (ODK= 0,138)	55
Çizelge 4.6. LAB izolatlarının otoagregasyon yeteneklerinin belirlenmesi.....	58
Çizelge 4.7. LAB izolatlarının <i>E.coli</i> ATCC 35298 ile %koagregasyon değerleri.....	59
Çizelge 4.8. LAB izolatlarının <i>S.aureus</i> ATCC 25923ile %koagregasyon değerleri	59
Çizelge 4.9. LAB izolatları ve <i>E.coli</i> ATCC 35298' in antibiyotik duyarlılıkları	60
Çizelge 4.10. % Laktik asit üretimi	62
Çizelge 4.11 : Kullanılacak postbiyotiklerin kod numaraları ve anlamları.....	62
Çizelge 4.12. LAB izolatlarının test bakterileri üzerinde oluşturduğu zon çapları	63
Çizelge 4.13. LAB postbiyotiklerinin test bakterileri üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi	64
Çizelge 4.14. LAB postbiyotiklerinin % antioksidan aktivitesi	64
Çizelge 4.15. Liyofilize postbiyotiklerin konsantrasyonlarına bağlı Caco-2 hücre canlılıkları (Kontrol canlılığı %98 olarak kabul edilmiştir.)	68
Çizelge 4.16. Liyofilize postbiyotiklerin IC50 değerleri.....	68
Çizelge 4. 17. LAB liyofilize postbiyotiklerinin Caco-2 hücre hattındaki apoptotik etkisinin belirlenmesi	70

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 2.1. LAB üyelerinin başlıca filogenetik grupları	18
Görsel 4.1. Kolostrumdan izole edilen mikroorganizma örnekleri	49
Görsel 4.2. Saf kültür izolatlarının gram boyama örnekleri	50
Görsel 4.3. Katalaz negatif (-) ve pozitif (+)sonuç örneği	51
Görsel 4.4. TSI agarda üreme, hareketlilik ve H ₂ S oluşumu.....	52
Görsel 4.5. pH 3,9 ve 9,6 da üreme görüntüleri (a: pH 3,9; b: pH 9,6).....	52
Görsel 4.6. %6, %7.5, %10 NaCl içeren ortamda üreme(a:%6 NaCl, b: %7.5 NaCl, c: %10 NaCl).....	53
Görsel 4.7. Hemolitik aktivite γ -hemolitik izolatların petri görüntüsü	54
Görsel 4.8. pH:2, pH:3 MRS broth asit ortamında ve kontrol ortamı olan pH 7 MRS broth ortamında 4 saat inkübe edilen LAB izolatlarının 0., 1., 2., 4. saatlerde MRS agarda gelişimleri)	57
Görsel 4.9. %0,3 ve %0,6 safra tuzu içeren MRS broth ortamında ve kontrol ortamı normal MRS broth ortamında 4 saat inkübe edilen LAB izolatlarının 0., 1., 2., 4. Saatlerde MRS agarda gelişimeri)	58
Görsel 4.10. Antibiyotik duyarlılıkları	61
Görsel 4.11. Laktik asit tayini deneyi titrasyon sonucu renk oluşumu	63
Görsel 4.12. Liyofilize postbiyotik örneklerinin mikrobrot h dilüsyon metodu sonucu E.coli üzerindeki antimikrobiyal etkisi	65
Görsel 4.13. Liyofilize postbbiyotiklerin Caco-2 hücre hattı üzerindeki % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	69

Görsel 4.14. Liyofilize LAB postbiyotiklerinin Caco-2 hücre hattındaki apoptotik etkisinin Annexin-V – PI yöntemi ile akış sitometride değerlendirilmesi.....	.72
--	-----

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α : Alfa

β : Beta

μg : Mikrogram

μl : Mikrolitre

ANOVA : Varyans Analizi

ATCC : Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu

BHT : Butilhidroksitoluen

cm : Santimetre

dk : Dakika

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO : Dimetilsülfoksit

DNA : Deoksiribo nükleik asit

DPPH : 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

EDTA : Etilendiamin tetraasetik asit

ELISA : Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi

FBS : Fötal Sığır Serum

FDA : Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

FITC : Floresan izotiyosiyanat

g/L : Gram/ Litre

GIS : Gastrointestinal Sistem

GRAS	: Generally Recognized as Safe
IC ₅₀	: %50 İnhibitör Konsantrasyon
IgA	: Immunoglobulin A
KK	: Kolorektal Kanser
L	: Litre
LAB	: Laktik Asit Bakteri
mg	: Miligram
MHB	: Mueller Hinton Broth
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
MRS	: Lactobacillus Agar acc. to De Man, Rogosa and Sharpe
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
NB	: Nutrient Broth
PBS	: Phosphate buffered saline (Fosfat ile tamponlanmış tuz)
Pen-Strep	: Penisilin-Streptomisin
PI	: Propidyum İyodid
RNA	: Ribo Nükleik Asit
SCFA	: Kısa Zincirli Yağ Asitleri
SK	: Sığır Kolostrumu
TSI	: Triple Sugar Iron (Üç Şekerli Demir)

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Son yıllarda düşük kaliteli gıda alımı ve modern yaşamın getirdiği hareketsiz yaşam tarzı, insan sağlığının bozulmasının nedenlerindedir. Bu modern yaşam tarzı, bağırsak mikrobiyotasında disbiyozu neden olur ve disbiyozun yirmi birinci yüzyılda yaygın olan çeşitli hastalıklarla bağlantılı olduğu çok sayıda çalışmada gösterilmiştir (Vyas ve Ranganathan, 2012).

Dengeli bağırsak mikrobiyotası, genellikle gastrointestinal sistemde (GIS) yaşayan dinamik, karmaşık ve birçok farklı mikroorganizmadan oluşur. Mikrobiyotanın dengede olması insan fizyolojisi ve beslenme açısından büyük önem taşır. İnsan vücudunda yaşayan bu bakterilere, konakçılarına yararlar sağlamaları karşılığında besin açısından zengin bir yaşam alanı verilir (Żółkiewicz vd., 2020; Sharma vd., 2009).

Mikrobiyotada meydana gelen disbiyoz durumunda önde gelen sağlık sorunlarından biri de kanserdir. Kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. 2020 yılında dünya genelinde yaklaşık 10 milyon kansere bağlı ölüm (melanom dışı cilt kanseri hariç 9,9 milyon) meydana gelmişken, tahminen 19,3 milyon yeni kanser vakası (melanom dışı cilt kanseri hariç 18,1 milyon) gerçekleşmiştir (Sung vd., 2021).

Kolorektal kanser (KK) en yaygın kanserlerden biridir. Kolorektal kanser, dünya çapında her yıl tahmini 1 milyon yeni vaka ve gelişmiş dünyada yaklaşık %33'lük önemli bir ölüm oranı ile kanser insidansının üçüncü önde gelen nedenidir. Batı ülkelerindeki artışla KK insidansının 2030 yılına kadar dünya genelinde 1,1 milyon ölüm ve 2,2 milyon vakaya yükseleceği tahmin edilmektedir (Cheng vd., 2020; Jobin, 2013).

Kanserde kullanılan tedaviler kemoterapi, radyasyon ve cerrahi operasyonları içermektedir. Kemoterapi ve radyasyona maruz kalmak genellikle ciddi yan etkiler ve hastaların yaşam kalitesinde bozulmaya sebep olabilmektedir. Bunların yanında kanserleri tedavi etmek için hastaneye yatış ve ilaç maliyetleri çok yüksek değerlerdedir ve sağlık sistemlerine fazlaca ekonomik yük getirmektedir. Bu olumsuzluklar, araştırmacıları kanseri tedavi etmek için uygun maliyetli ve daha az yan etkileri olan alternatif tedaviler aramaya teşvik etmektedir. Sonuç olarak; bu amaçla, bitki ve hayvanlardan izole edilen antikanser bileşiklerin klinik olarak

değerlendirilmesi, kanser riskini azaltan gıda takviyeleri geliştirmek ve optimum beslenme dizaynının önemini göstermek için birçok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmalar içerisinde probiyotik mikroorganizmalar konak üzerindeki etkileri düşünüldüğünde önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir (Fuller, 1986; Lakritz, 2014; Bagwe-Parab, 2020).

Sığır kolostrumu (SK), antikanser etki gösterme potansiyelinden ötürü araştırmacıların dikkatini çekmiştir. SK, güçlü antioksidan, antiinflamatuvar, anti-kanser ve anti-mikrobiyal özelliklere sahip bir glikoprotein olan laktoferrin açısından zengindir. Kolostrum probiyotik özellikli bakteriler açısından da fazlaca çeşitlilik içermektedir (Bagwe-Parab, 2020; Xu vd., 2021).

Tüm vücudu etkileyebilen dengeli bir bağırsak mikrobiyotasının oluşmasını sağlayan probiyotikler; bağırsak epiteline tutunarak patojenlere karşı bir bariyer oluşturmaktadırlar. Probiyotik mikroorganizmalar genel olarak laktobasiller, bifidobakteriler, enterokoklar ve streptokoklardan oluşan faydalı mikroorganizmalardır (Trichopoulos, 2005).

Genel olarak probiyotiklerin kanser önleme mekanizması; prokanserojenlerin kanserojene dönüşümünü engelleme, mutajenlerin inaktive edilmesi veya bağlanması, pro-kanserojen özelliğe sahip bakterilerin üremesini kısıtlama, kanserojen emiliminde azaltma, safra tuzu konsantrasyonunun dengede tutulması, bağışıklık sisteminin güçlenmesine katkı gibi yararlarını içermektedir (Leroy vd., 2008).

Probiyotiklerin olumlu yöndeki etkileri uygulanan suşa, uygulama şekline, bireye ve uygulamanın şartlarına bağlı olarak değişmektedir. Canlı mikroorganizmalar bazı insanlarda temel kullanım sorunları oluşturabilecek riskler taşımaktadır. Bu riskler canlı olmayan bakteri hücrelerinin ve bunların bileşenlerinin probiyotik işlevsellik üzerindeki potansiyel etkisi düşüncesini tetiklemiştir. Son zamanlarda bu düşüncenin kabul görülmesi ve bu yöndeki ilerleyiş "postbiyotik" teriminin ortaya çıkmasına yol açmıştır (Sharma vd., 2022; Marco vd., 2006).

Postbiyotikler; konakçıya fizyolojik faydalar sağlayan, ekstrakte edilmiş veya salgılanmış herhangi bir molekül olarak tanımlanabilir. Bu biyojenikler; hücresiz süpernatantları, metabolik ürünleri veya yan ürünlerini (biyoaktif çözümler bileşenleri),

hücre bileşenlerini ve bakteriler tarafından üretilen maddeleri içermektedir (Cicenia vd, 2014; Moradi vd., 2020).

Postbiyotiklerin etkili olabileceği mekanizmalar arasında immünomodülasyon, enfeksiyonların önlenmesi, anti-tümör ve anti-aterosklerotik etkiler, otofaji düzenlenmesi ve yara iyileşmesinin hızlandırılması bulunmaktadır. *İn vivo* ve *in vitro* modellerin kullanımıyla postbiyotiklerin biyoaktivitesinin derlendiği bir çalışmanın sonucunda ise ortaya çıkan bazı etkiler, immünomodülatör, anti-inflamasyon, anti-proliferatif, anti-oksidan, anti-obezojenik, hepatoprotektif ve antimikrobiyal etkilerdir (Żółkiewicz vd., 2020; Aguilar-Toalá vd., 2018).

Bu tez kapsamında; 21 gün fermente edilmiş kolostrumdan laktik asit bakterilerinin izolasyonu, klasik ve moleküler yöntemlerle tanımlanması, otoagregasyonve koagregasyon yetenekleri, biyofilm oluşturma yetenekleri, antibiyotik duyarlılıkları, antimikrobiyal aktivite tastleri, laktik asit üretimi, hemolitik aktiviteleri, pH, tuz, safra tuzu ve asit dirençleri ve Caco-2 hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla öncelikle; izole edilen laktobasil suşlarından probiyotik olduklarını belirlediğimiz laktobasillerin probiyotik olma özellikleri taranmış, bu özelliklere sahip olan laktobasil suşlarının kültür süpernatantları liyofilize edilerek biyolojik aktiviteleri belirlenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kolostrum

Yenidoğan bir memelinin ilk besini olan kolostrum bazen "yaşam iksiri" olarak anılır ve doğanın armağanı olarak kabul edilir. Kolostrum, doğum sonrasında 2-4 gün süresince salgılanan süttür. Temel biyolojik görevi, savunmanın en düşük olduğu yaşamın ilk evresindeki yenidoğanın patojenlere karşı bağışıklık kazanmasını sağlamakla birlikte büyüme ve gelişmesini desteklemek olan kolostrum “erken süt” olarak da bilinmektedir (Tripathi ve Vashishtha, 2006).

Bir diğer ifade ile kolostrum yenidoğan canlıının besin ihtiyaçlarını oldukça konsantr ve düşük hacimli bir şekilde almasını sağlayan doğum sırasındaki kan-süt bariyerindeki açıklıktan kaynaklanan özellikleriyle kana benzeyen, doğan yavrunun plasenta süreci beslenmesinden süt beslenmesine adaptasyonunu sağlayan yapışkan, kanlı, sarımsı bir sıvıdır (Bernabucci vd., 2013; Shah, 2000; Sangild vd., 2021).

Kolostrum; yenidoğanın mikroorganizma bakımından zengin doğum sonrası ortam ve enteral anne sütüne annenin göbek bağı besin kaynağı ile sürdürülen çoğunlukla steril fetal yaşamdan geçişinde besleyici, immünolojik ve antimikrobiyal bir "köprü" işlevi görür. Memeli türlerinde kolostrum ve olgun süt şeklinde farklı meme salgılarının sağlanması, bin yılda gelişen temel bir hayatta kalma işlevidir. İnsanlarda, doğumdan hemen sonra kolostrum üretimi başlar ve onu takiben, doğumdan sonraki iki hafta salgı aktivasyonu giderek farklılaşır ve sonunda olgun süt olarak kabul ettiğimiz artmış süt hacmine geçilene kadar bu dönem devam eder (Sangild vd., 2021).

Kolostrumun önemi, çok eski zamanlarda fark edilmiş olduğundan buzağı doğduktan sonra birçok ülkenin geleneklerine göre kutlamalar yapılmaktadır. Bazıları sığır kolostrumundan pasta yaparken, İskandinav ülkelerinde ise insanların hazırladıkları kolostrum ve baldan oluşan tatlıyı kutlama amacıyla tükettikleri bildirilmektedir (Rocha, 2016; Thapa, 2005).

2.1.1. Kolostrum bileşenleri

Kolostrum; plasental kaynaklı amino asit ve glikoz kaynaklı temel besinlerden, proteinler ve laktoz gibi daha karmaşık makromoleküllerin ağızdan alımına geçiş

sürecinde gerekli besinleri sağlar. Yenidoğanın doğum kanalı mikro florasına ve doğum sonrasında da çevreden gelecek birçok mikroorganizmaya karşı adaptif bağışıklığın olgunlaşmasına kadar yenidoğanın doğal bağışıklığını destekleyen bağışıklık koruması sağlamaktır. Kolostrum bu yönüyle pasif bağışıklığı sağlayacak koruyucu antikolar içermektedir ve aynı zamanda IgA'nın da ana kaynağıdır (Goldman, 2002; Thaba, 2005; Buttar vd., 2017).

Kolostrum bağırsağın uç bölgelerine ulaşıncaya dek biyoaktivitesini korumaya yardımcı ve yıkımını önleyen koruyucu ve onarıcı maddeler arasında sinerjistik tepkileri sağlayan kombinasyon halinde paketlenmiştir (Playford., Weiser., 2021).

Hayvanlarda yenidoğanların hayatta kalması için kritik olan kolostrum, insanlarda hayatta kalmak için olmasa bile önemli bir bileşendir. Bu yüzden yeterli kolostruma sahip olmayan annelerde bebekler için sığır kolostrumu güvenilir bir alternatif olabilmektedir. İnsanlar ve diğer memeliler genellikle aynı dış ortamı paylaşırlar ve vücudun dış yüzeyleri (deri, akciğerler ve bağırsaklar) boyunca benzer bakterilere, virüslere ve mantarlara maruz kalırlar. Sonuç olarak, bir türden kolostrumun antimikrobiyal aktivitesi başka bir türde de kısmen etkili olmaktadır. "Kolostrum köprüsü" bu özellikleri nedeniyle önem taşımaya karşın sığır ve insan kolostrumu arasında hem besinsel hem de immünolojik faktörler açısından belirgin farklar vardır. Ayrıca sığır kolostrumu insan kolostrumundan 100 ile 1000 kat kadar daha fazla aktiviteye sahiptir (Buttar vd., 2017; Stevens vd., 2009; Sangild vd., 2009).

Sığır kolostrumunun kalitesi ve bileşimi, cins, parite, sağım zamanlaması, hastalıklar, doğum öncesi beslenme, mevsim, kuru dönem uzunluğu gibi genetik ve çevresel faktörler nedeniyle oldukça değişkendir (Nowak vd., 2012; Hyrslova vd., 2016).

Fizikokimyasal özellikleri ve bileşim bakımından oldukça değişken ve dinamik olan kolostrum daha fazla miktarda protein, mineraller, vitaminler, immüoglobulinler, antimikrobiyal peptitler (lizozim, laktoferrin ve laktoperoksidaz) ve büyüme faktörleri içerdiğinde dolaylı laktasyon sütünden ayrışmaktadır (McGrath vd., 2016; Silva vd., 2019).

Çizelge 2.1. Temel bileşen içeriği açısından kolostrum (Tripathi ve Vashishtha, 2006)

KOLOSTRUM BİLEŞENLERİ		
Besin Faktörleri	İmmün Faktörler	Büyüme Faktörleri
Karbonhidrat	İmmüoglobulinler (IgA, IgG, IgM, IgD ve IgE)	EGF
Protein	Sitokinler	TGF- α ve TGF- β
Yağ	Laktoferrin	IGF-I ve IGF-II
Mineral	β -laktoglobulin	VEGF
Vitamin	α -laktoalbumin	PDGF
	Lizozim	
	Oligosakkaritler	
	Polipeptitler	

2.1.2. Kolostrum bakteri içeriği

Yenidoğanın öncü mikrobiyal kaynağı olan kolostrumda, sütte ki fonksiyonel bileşenler dışında bol miktarda bakteri bulunduğu çok sayıda çalışma tarafından gösterilmiştir. Bunların bağırsak mikrobiyotasının gelişimini ve bakterilerin neden olduğu bağırsak bağışıklık sisteminin gelişimini etkileyebildiği bilinmektedir (Quigley vd., 2013; Pannaraj vd., 2017).

Sığır kolostrumu kalitesi ikinci buzağılamadan sonra giderek artar ve yaşlı inekler en kaliteli kolostrumu üretirler. Bu durumun artan patojen maruziyetiyle gelişmiş bağışıklığın ve vücut kondüsyon skorunun bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Kolostrum mikrobiyotasının, çeşitliliği açısından yapılan bir çalışmada primipar (ilk doğumu olan) sığırların kolostrum mikrobiyotasının multipar (çok kez doğum yapmış) sığırlara göre daha zengin olduğu görülmüştür. Bunda kuru dönemden kaynaklı artan

mastitise (meme bezi parankiminin iltihaplanması) bağlı antibiyotik tedavisinin etkili olduğu düşünölmektedir (Karav vd., 2021; Falentin vd., 2016).

Kolostrum mikrobiyal çeşitliliğini saptamak için 70 Holstein ineğinden 4 meme bezi çeyreğinin hepsinden toplanan kolostrum örnekleriyle yapılan bir çalışmada 16S rRNA dizi analizi kullanılarak mikrobiyom analiz edilmiştir (F. Lima, Teixeira, S. Lima, Ganda, Higgins, Oikonomou, Bicalho, 2017).

Çizelge 2.2. 70 Farklı sığırdan toplanan kolostrumda bulunun bakteri taksonları ve parite farklarına göre yüzdeleri *Başlardaki harfler taksonomik birimi ifade etmektedir. t(takım), f(familya), c(cins) tanımlanan bakterinin taksonomik sınıfını ifade eder (F. Lima, Teixeira, S. Lima, Ganda, Higgins, Oikonomou, Bicalho, 2017).

Mikroorganizma	Primipar	Multipar
c_ <i>Staphylococcus</i>	%19.47	%12.8
c_ <i>Prevotella</i>	%7.7	%6.825
f_ <i>Ruminococcaceae</i>	%4.9	%5.5
t_ <i>Bacteroidales</i>	%4.95	%4.6
t_ <i>Clostridiales</i>	%4.45	%4.225
c_ <i>Pseudomonas</i>	%3.75	%5.2
c_ <i>Fusobacterium</i>	%3.425	%4.575
f_ <i>Planococcaceae</i>	%3.5	%3.975
f_ <i>Enterobacteriaceae</i>	%3.175	%4.1
t_ <i>Actinomycetales</i>	%3.5	%3.225
c_ <i>Acinetobacter</i>	%2.325	%3.65
c_ <i>Bacteroides</i>	%1.15	%2.675
c_ <i>Halomonas</i>	%2.025	%2.2
f_ <i>Lachnospiraceae</i>	%1.95	%1.85
c_ <i>Mycoplasma</i>	%2.3	%2.075
c_ <i>Ruminococcus</i>	%1.55	%1.425
c_ <i>Corynebacterium</i>	%1	%1.3
f_ <i>Pseudomonadaceae</i>	%1.3	%1.4
c_ <i>Porphyromonas</i>	%1.075	%1.175
c_ <i>Bacillus</i>	%0.75	%1.15

Bir başka çalışmada ise; kolostrumun M17 ve %0.05 sistein içeren pH= 5.4 olan De Man, Rogosa ve Sharpe agar (MRS) ortamına ekilmesi sonucu 29 suş izole edilmiştir. Suşlar 16S rRNA dizi analizi yöntemiyle tanımlanmıştır. *Staphylococcus chromogenes* en sık izole edilen tür olurken iki potansiyel probiyotik tür olan laktik asit

bakterisi (LAB) türü (*Lactobacillus casei* ve *Bifidobacterium pseudolongum*) MRS besi ortamından geri kazanılmıştır (Lindler vd., 2011).

Çizelge 2.3. Kolostrum örneklerinden kültüre alınan suşlar (Lindler vd., 2011).

Suş	İzolat sayısı	Besiyeri orijini	Tahmin edilen suş	Accession numarası	%
1-4	2	MRS CYS pH= 5.4	<i>Lactobacillus casei</i>	HM058411	100
2	1	M17	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	FJ858975	98
3-8-9-10- 11-13-15- 17-18-19- 21-25	12	M17	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	AY688044	99
5-6	2	MRS CYS pH= 5.4	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	GU361828	99
7	1	MRS CYS pH= 5.4	<i>Propionibacterium acnes</i>	EF680442	99
12-16	2	M17	<i>Brachybacterium sp.</i>	AB449755	98
14	1	M17	<i>Streptococcus uberis</i>	AM946015	99
20	1	M17	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	FJ174659	99
22	1	M17	<i>Bacillus circulans</i>	EU653002	100
23	1	M17	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	GU904705	99
24-26	2	M17	<i>Uncultured bacterial clone</i>	GQ055058	99
27-29	2	MRS CYS pH= 5.4	<i>Paenibacillus graminis</i>	AB428571	99
28	1	M17	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>	AY729960	99

Sığır kolostrumu, özellikle *Bifidobacteriaceae* ve *Lactobacillaceae* familyasının üyelerinin bağırsak mikrobiyotasında büyümesini destekleyen frukto-oligosakkaritler, galakto-oligosakkaritler, gangliozitler ve nükleositler gibi prebiyotik bileşikleri içermektedir (Grigas vd., 2021).

Yapılan bir diğer sığır kolostrumu mikrobiyom analizi çalışmasında ise; en fazla *Lactococcus* cinsi bakteriler tanımlanmıştır. *Lactococcus* cinsi bakterilerinin yoğunluğu soğutmaya maruz kaldığında; bağıl bolluğu ortalama %13.6' dan %0.5' in altına

düştüğü görülmüştür. *Lactococcus*'un insan kolostrumunda da yaygın olarak bulunduğu bilinmektedir (Rubio vd., 2012; Yeoman vd., 2018).

Kolostrumda yoğun olarak *Proteobacteria* (ortalama %42), *Firmicutes* (ortalama %22) ve *Bacteroidetes* (ortalama %21) filumuna ait bakterilerin bulunduğu belirlenmiştir. Soğutmanın ardından bazı cinslerin nispeten azaldığı görülürken, *Proteobacteria* filumunun çoğunlukla sınıflandırılmamış cinsinde 1.5-2 kat artışa karşılık gelmiştir. Genel anlamda sığır kolostrum mikrobiyomu soğutma işleminden etkilenmektedir (Yeoman vd., 2018).

Kolostrum örneklerinde birçok probiyotik özellikli bakteri bulunmaktadır. Yapılan farklı bir çalışmada *Bacillus circulans* (toplanan numunelerin %75' inde mevcut), *Lactobacillus plantarum* (%75) ve *Bacillus subtilis* (%55) dahil olmak üzere bazı ortak yararlı bakteriler tanımlanmıştır (Xu vd., 2021).

2.2. Probiyotikler

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO)' ne göre "Yeterli miktarlarda uygulandığında konakçıya yarar sağlayan canlı mikroorganizmalar" tanımı dünya çapında probiyotiklerin yaygın olarak kabul gören bilimsel tanımıdır. Birçok gıda ve takviyede canlı mikroorganizma bulunabilir, ancak; sadece sağlık üzerinde kanıtlanmış olumlu etkisi olan karakterize edilmiş suşlar probiyotik olarak adlandırılmaktadır (ISAPP, 2014).

2.2.1. Probiyotiklerin genel özellikleri

Probiyotik özellikli bakteriler gram özelliği bakımından pozitif, spor oluşturmeyen ve basil olarak bilinmektedir. Sıcaklık, oksijen ve pH gibi faktörler probiyotikler için oldukça etkilidir. Bu yüzden probiyotiklerin kullanılabilir olması için düşük pH' ya sahip mide asitliğine, enzimlere ve safra tuzlarına karşı dayanarak canlılıklarını koruyabilmeleri gerekmektedir. *Laktobasil* ve *Bifidobakteri* türleri probiyotiklerin en önemli grubunu oluşturmaktadır. Bununla birlikte diğer bazı maya ve küf türleri de probiyotik olarak kullanılabilir (Ljungh ve Wadstrom, 2006; Soccol ve diğerleri, 2010).

Bir bakterinin probiyotik olarak olarak tanımlanabilmesi ve kullanılabilmesi için taşınması gereken bazı kriterler bulunmaktadır. Bunlar aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- **Asit ve safra tuzlarına direnç;** GIS' de probiyotik olacak mikroorganizmanın hayatta kalabilmesi için midede maruz kalacağı düşük pH' dan etkilenmemesi gerekmektedir. Probiyotikler aynı zamanda safra tuzlarının ouşturacağı koşullardan etkilenmeden bağırsakta metabolize edilebilmelidir (Shah, 2001).
- **Tutunma özelliği:** Tutunma özellikleri probiyotik bakterilerin en önemli özelliklerindedir. Probiyotiklerin kolona tutunmaları ve koloni oluşturmaları patojenlerin tutunmalarını önleyerek koloni oluşturmalarını azaltma ve bu sayede immun sistemin modülasyonunu ve mukozanın iyileşmesine etkisi bakımından önem arz etmektedir (Ouweland vd., 2002).
- **Güvenlik:** Probiyotik olarak kullanılacak olan mikroorganizmalar güvenli olmalıdır. Yani toksin üretmemeli ve patojen olmamalıdır. Bu yüzden suşların doğru bir şekilde tanımlanmaları gerekmektedir (Yerlikaya vd., 2008).
- **Üretilebilir ve depolanılabilir olma özelliği:** Probiyotiklerin yüksek konsantrasyonda yaşayabilmesi ve kültürlerin hazırlaması, depolanması ve taşınmasında stabil kalması gerekmektedir. Fermantasyon ve besinlere katıldığı esnada istenilen kalitede üretim yapılabilmelidir (Shinde, 2012).

Son olarak, klinik açıdan raporlanmış sağlık bakımından bir faydasının olması ve patojen bakterilerin üremesine karşı sentezledikleri maddeler gibi anti-mikrobiyal özellikte maddeler üretmesi gerekmektedir (Saarela ve diğerleri, 2000).

Çizelge 2.4. *Laktobasil ve Bifidobakteri türlerinden probiyotik olarak kullanılanlara bazı örnekler (Salminen, 1998).*

CİNSLER	TÜRLER
<i>Lactobacillus türleri</i>	<i>Lactobacillus lactis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus reuteri</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus johnsonii</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus cellebiosus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus curvatu</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus salivarius</i> <i>Lactobacillus gasseri</i>
<i>Bifidobacterium türleri</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium adolescentis</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium breve</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium thermophilum</i>

2.2.2. İnsan sağlığı üzerinde probiyotiklerin etkileri ve bağırsak mikrobiyotası

Son yıllarda insan mikrobiyotasının sağlık için önemi net bir şekilde ortaya konmuştur. Hamilelik ve sonrasındaki mikrobiyotanın; bağışıklık sisteminin erken programlanması, yetişkin bağışıklık fonksiyonunu destekleme, mikrobiyomun genel sağlığı belirleyen önemli faktörleri olarak bilinmektedir. Bu yönüyle probiyotik kavramı yaşamın tüm evrelerinde mikrobiyal etkileşim yoluyla insan sağlığının iyileştirilmesi için sağlık hizmetleri, gıda ve tüketiciler gibi birçok alanda giderek daha fazla önem kazanmaktadır (Selma-Royo vd., 2019; Salminen vd., 2021).

İnsan bağırsağı; mikrobiyota, konakçı, hücre ve besinlerin yoğun etkileşimde olduğu bir ekosistemdir. Bu ilişki uzun süre bağırsak mukozasını istila eden, değiştiren ve yayılarak sistemik enfeksiyona sebep olan toksinler sebebiyle sadece patojenik yönüyle ele alınmıştır. Daha sonra çeşitli *Laktobasil* türleri, hastalıkların önlenmesinde kapsamlı bir şekilde incelenmiştir ve probiyotiklerin bağırsak mikrobiyotasındaki

mikroorganizma popülasyonunu değiştirebileceği gibi bağırsak mikrobiyotası ekosisteminin işleyişini kontrol edebileceği ortaya konmuştur (Butel, 2014).

Hastalıkların tedavisinde bağırsak mikrobiyotasının probiyotik türlerle modifiye edilmesi son dönemlerde daha da ön plana çıkmıştır. Bu probiyotik türlerinin tedavi potansiyeli araştırmacıları probiyotiklerin üretimi ve bağırsak mikrobiyotasının modülasyonunu daha kapsamlı incelemeye teşvik etmiştir (Metchnikoff, 1908; Fata vd., 2017).

Antibiyotik kaynaklı ishali azaltmaya, sindirim sorunlarını düzeltmeye, emen bebeklerde kolik semptomlarını ve egzama gibi atopik sorunların azaltılmasına, erken doğan bebeklerde nekrotizan enterokoliti azaltmaya, laktoz sindirim sorunlarını azaltmaya yardımcı olurken, akut pediatrik enfeksiyöz ishali tedavi etmek ve üst solunum yolu, bağırsak enfeksiyonu riskini veya süresini azaltmak gibi sağlık yararları mevcuttur (ISAPP, 2014).

2.2.3. Probiyotikler ve kanserde kullanımı

Probiyotiklerin gösterdiği antikanserojenik ve antimutajenik aktivite, organizmaların gelişim esnasında salgıladıkları bileşiklerden kaynaklanacağı gibi kanserojenlere dönüşecek prokanserojenlere etkili mikroorganizmalara karşı gösterdikleri antagonistik etkiyle de açıklanabilir. Probiyotikler fekal enzimlerin (bunlar prokanserojenleri kanserojen maddelere dönüşmesini sağlayan enzimler) aktivitelerini önlerler (Kılıç, 2001)

Bağırsak mikroorganizma içeriğinin dağılımında ve sindirim enzimlerinin aktivitesi üzerinde *L. acidophilus*'un faydalı etkilerinin olduğu ve kolon kanseri ihtimalini azalttığına işaret etmektedir. *Bifidobacterium* türlerinin antitümör aktivitesinin hücre duvarında bulunan muramilpeptinaz gibi bileşiklerle ilgili olduğu düşünülürken, *L. acidophilus*'ta bu etki hakkında iki açıklama bulunmaktadır. Bunlardan birincisi bağırsak sisteminde oluşabilecek kanserojenik bileşiklerin oluşmasına engel olmak, diğeri ise konakçının bağışıklığının güçlendirilmesi veya kanser oluşumunun baskılanmasıdır (Özbaş, 1993).

Genel olarak probiyotiklerin kanser önleme mekanizması prokanserojenlerin aktif kanserojene evrilmesini engelleme, mutajenlerin inaktive edilmesi veya bağlanması, kanserojenlerin emilimini inhibe etme, pro-kanserojen özellikteki bakterilerin üremesini durdurma, bağışıklığın artırılması, safra tuzu konsantrasyonunun dengeye getirilmesi gibi sağlık açısından faydalı işlevleri barındırır (Leroy vd., 2008).

2.2.4. Probiyotikten postbiyotiğe geçiş

Probiyotik kullanımı bağırsak bariyeri bozulmuş, bağışıklığı düşmüş, sepsis ve prematüre bebekler gibi bazı insanlar için risk oluşturabilmektedir. Bu nedenle ölü bakteri suşlarının, bakteri parçacıklarının ve metabolizma ürünlerinin benzer terapötik uygulaması oldukça kullanışlıdır. Ölü probiyotik bakteriler ve hücre bileşenleri parabiyoitik olarak adlandırılırken, canlı bakteriler tarafından salgılanan metabolitler/hücesiz süpernatantlar ve çözünür faktörler postbiyotik olarak adlandırılmaktadır (Floch 2013; Vahabnezhad vd., 2013; de Almada vd., 2018; Martin ve Langella, 2019; Barros vd., 2020).

Canlı probiyotik mikroorganizmaların uygulanmasına bağlı potansiyel risk olmadan konakçıya biyolojik faydalar sağlanması, parabiyoitik ve postbiyotikleri kullanıma daha açık hale getirmiştir (Barros vd., 2020).

Postbiyotikler, içerik bakımından genel olarak kısa zincirli yağ asitleri (SCFA'lar), teikoik asitler, peptidler, enzimler, peptidoglikan türevli muropeptitler, endo ve ekzopolisakkaritler, vitaminler, hücre yüzey proteinleri, plazmalojenler ve organik asitleri içermektedir (Aguilar-Toalá vd., 2018).

Organik asitler, SCFA, Trp ve bakteriyosinler önemli postbiyotiklerdir. Postbiyotiklerin yararları doğrudan veya dolaylı olabilir. Konakçı hücre üzerinden etkisi doğrudan olurken, dolaylı olarak sağlığa faydalı mikroorganizmaların yayılmasına destek olup zarar veren suşların gelişimini ise engelleyerek gerçekleştirmektedir. SCFA'ların en önemli etkisi anti-inflamatuar ve antioksidan özelliğidir (Aggeletopoulou vd., 2019; Oleskin vd., 2020).

Postbiyotikler, gösterdikleri farklı fizyolojik faydalara (antiinflamatuar, antioksidan, antiproliferatif, antimikrobiyal, antihipertansif, hipokolesterolemik ve

immünomodülatör aktiviteler) göre veya hem bakteriyel hücre bileşiklerinden hem de mikrobiyal etkiden türetilen bileşimlerine göre farklı kategorilerde sınıflandırılabilmektedirler (Barros vd., 2020).

2.2.4.1. Günümüzde kullanılan bazı parabiyotik-postbiyotikler

Bu preparatlar, hücresiz süpernatantlar başta olmak üzere ekzopolisakkaritler, enzimler, hücre duvarı parçaları, kısa zincirli yağ asitleri (SCFA'lar), bakteriyel lizatlar ve bağırsak mikrobiyotası tarafından üretilen metabolitleri içermektedir (Żółkiewicz vd., 2020).

Biyolojik aktif metabolitleri içeren hücresiz süpernatantlar belirli bir inkübasyon süresi sonunda probiyotik bakteri içeren kültürün santrifüj edilerek süpernatantın filtreden geçirilip steril edilmesiyle elde edilir.

Her farklı mikroorganizma kültür süpernatantı farklı etkiler gösterir. Yapılan çalışmalarda *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi bakteri kültürlerinden elde edilen süpernatantların son zamanlarda enteroinvaziv *E. coli* suşlarının *in vitro* enterositlere invazyonunu önleyerek antibakteriyel aktivite sergiledikleri gösterilmiştir. *L.acidophilus* ve *L. casei* süpernatantları ise; TNF- α sitokinininin salgısını azaltarak, IL-10 sitokin salgısını artırarak bağırsak epitel hücreleri, makroajlar ve nötrofiller üzerinde antiinflamatuvar ve antioksidan etkiler oluşturabilmektedirler (Khodai vd., 2017; De Marco vd., 2018).

L.plantarum süpernatantları da bağırsak bariyerinin olgunlaşması ve morfolojik yapısı üzerinde olumlu etkiye sahiptir. Bu arada, *L. casei* ve *L. rhamnosus* kültürlerinden elde edilen süpernatantlar, kolon kanseri hücrelerinin invazyonunu önleyebildiği görülmüştür. Hücresiz süpernatantlar oksidatif stresi azaltabilir ve doğrudan antitümör aktivite sağlarlar bu sayede kanserin önlenmesinde klinik olarak faydalı olabilirler (Escamilla vd., 2012; Amaretti vd., 2013; Izuddin vd., 2019).

2.3. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB), dış ortamdaki karbonhidratları metabolize etmesi sonucu laktik asit üreten bakteri sınıfı için kullanılan genel bir terimdir. İnsan yaşamı ile yakından ilgili değerli biyolojik kaynaklar olmasının yanında önemli sosyal, ekonomik

değere sahiptirler. LAB' ların insanlar tarafından kullanımı çok eski zamanlara dayanmaktadır. Günümüzde LAB' lar takviye gıda, probiyotik olarak oldukça yaygın kullanıma sahiptir (Tian, 2019).

2.3.1. LAB'ların genel özellikleri

GRAS (Generally Recognized as Safe) statüsünde güvenli kabul edilen probiyotik mikroorganizmaların ana gruplarından biri olan LAB' lar gram pozitif, katalaz negatif, hareketsiz, spor oluşturmeyen, sitokromdan yoksun, aerotolerant anaerob, aside dayanıklı, nitratı indirgemeyen, basil, kok ve koko-basil morfolojisine sahip kalabalık bir gruptur (Hofvendahl vd., 2000; O'Sullivan et vd., 2002).

LAB olarak adlandırılmalarının asıl sebebi; karbonhidrat fermantasyon metabolizması sonucu son ürün olarak laktik asit üretmeleridir. Üreme ve gelişimleri için glikoz ve amonyum yanında bazı vitamin ve aminoasitler gibi kompleks besinlere ihtiyaç duyan LAB' lar oksijen yerine son elektron alıcısı olarak endojen karbon kaynaklarını kullanarak enerji elde ederler ve peroksidazlar tarafından hidrojen peroksit gibi oksijen yan ürünlerine karşı korunurlar (Holzapfel vd., 2007; Wright ve Axelsson, 2011).

Gıda canlı mikrobiyal katkı maddesi olarak bilinen n iyi probiyotikler LAB' larıdır. Gelişim gösterdikleri optimal ortam 6.5-6.8 pH ve 35-40°C sıcaklıktır. LAB'lar pH' yı 3.2-3.5' e kadar ürettikleri %1-3 oranındaki laktik asit ile düşürürler; bu sayede aside dayanıklıdırlar. Doğada karbonhidratça zengin substratların olduğu ortamlarda bulunan LAB türleri, süt ve süt ürünlerinde, insan ve diğer canlıların sindirim sistemleri, diş ve ağız içerisindeki yarık ve boşluklar, vajina, ayrıca bazı iç organlar gibi farklı yerlerde bulunabilirler (Tannock, 2004; Ljungh ve Wadström, 2006).

Hidrojen peroksit (H_2O_2), bakteri hücre zarındaki ve hücre proteinlerindeki lipidlerin sülfidril gruplarını okside ederek bakterisidal etki gösterme avantajı sağlarken LAB' lar katalaz negatif olduklarından ürettikleri metabolit olan hidrojen peroksitle parçalanmadan kalabilirler ve diğer mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkileri olur. Yapılan diğer çalışmalarda H_2O_2 üreten bakterilerin aerobik ortamı anaerobik ortama oksijeni kullanarak çevirdikleri ve aerobik mikroorganizmaların hücre zarı

geçirgenliklerini bozmak suretiyle antimikrobiyal etki gösterdiklerini bildirmiştir (Ramos vd., 2012; Lukic vd., 2018).

LAB' ların çoğu, insan gastrointestinal sisteminin (GIS) normal florasıdır ve insanlarda immünomodülasyon, antialerjik etkiler, antifungal etkiler ve kolon kanserine karşı koruma gibi çeşitli faydalı etkiler sağlamaktadırlar.

Bir LAB' ın probiyotik olarak kabul edilmesi için gerekli özellikler (Di Cerbo vd., 2016) şunlardır;

- Antibiyotiklere duyarlı ve yan etkileri az olmalıdır.
- Mikrobiyota içerisinde kolaylıkla tanımlanabilmelidir.
- Konak organizmaya nonkarsinojenik, nonpatojen ve noninvazif olmalıdır.
- Sabit, ürün içerisinde canlılık, fajlara dirençli, oksijene dirençli, liyofilize preparat yapılabilen bir suş olması gerekmektedir.
- Klinik etkinliğinin bilinmesi gerekmektedir.
- İmmun sistemin düzenlenmesi, patojenlerin tutunmasını (biyofilm oluşumunu) önlemesi ve antagonistik olması, mukoza yüzeyine tutunarak geçici kolonizasyon sağlayabilmelidir.
- Konak canlıda immünolojik duyarlılığa, sistemik toksisiteye ve dirençli mikroorganizmaların gelişmesine sebep olmamalıdır.
- Düşük pH şartlarına ve safra tuzlarına dirençli olmalıdır.
- Antimikrobiyal bileşikler üretebilmelidir.
- GIS' te geçici bir kolonizasyon sağlamalıdır.
- Konak dokusuna yerleşmesi uzun etkinlik için gereklidir.
- Doğal biyotaya uyum sağlayabilmelidir.
- Konak mikrobiyotasını bozmadan patojen bakterileri etkilememelidir.

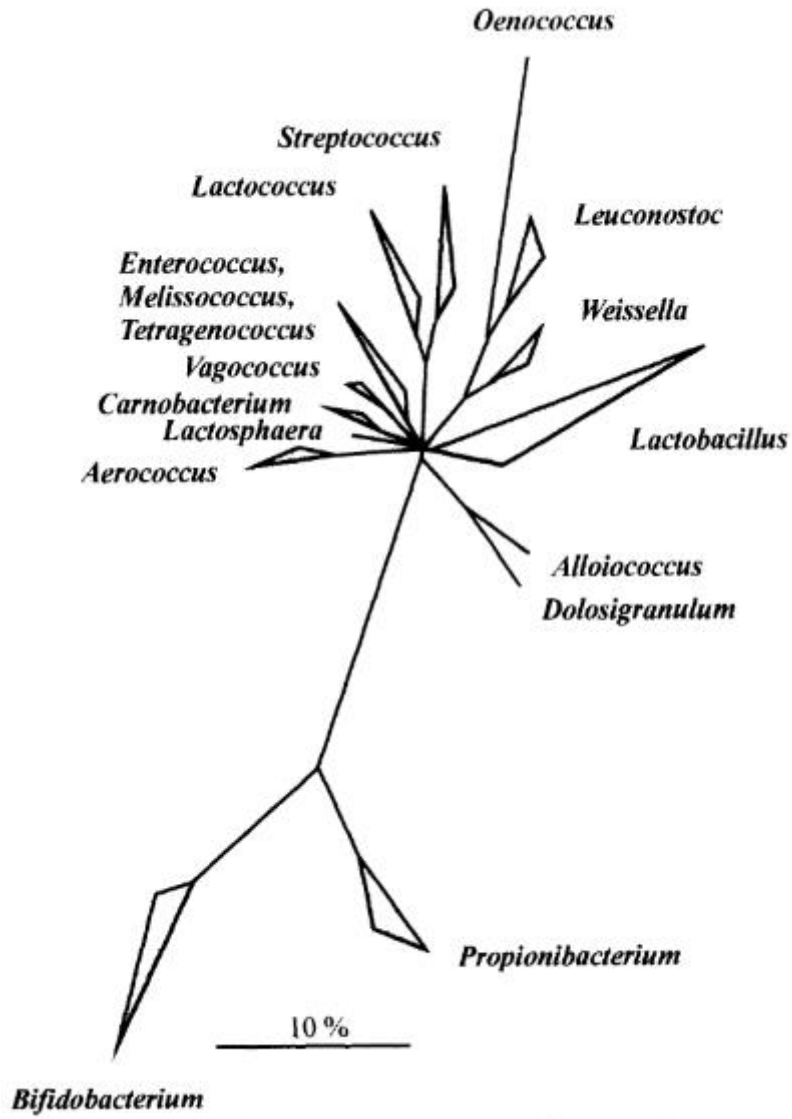
2.3.2. LAB' ların sınıflandırması

LAB' lar *Firmicutes* filumunda farklı bakteri cinslerinden oluşmaktadır. Gruptaki önemli cinsler, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Lactosphaera*, *Melissococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Weisella* ve *Tetragenococcus* tur (Marsh, 1999; Salminen vd., 2004).

LAB' ların cins bakımından sınıflandırılmalarında morfoloji, üretilen laktik asit farklılıkları, farklı sıcaklıklarda gelişme, tuz yoğunluğuna göre gelişim, glikozu fermente etme şekli ve asit-alkali ortamları tolere etme gibi seçici özelliklerinden faydalanılmaktadır. LAB' ların glikozu fermente ederken izledikleri metabolik yollar temel alınarak homofermantatif ve heterofermantatif olarak iki ana grupta incelenmektedir (Khalid, 2011; Axelsson, 2004; Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011; Khalid, 2011).

Glikozu, karbon kaynağı olarak kullanan LAB' lar homofermantatif, asıl metabolik yolun glikozis (Embden–Meyerhof-Parnas yolu) olduğu ve %85'den fazla laktik asit üretildiği yoldur. Ya da heterofermantatif bakterilerin metabolik yolu olan 6-fosfoglukonat/fosfoketolaz yolu ve laktik asitle aynı miktarda karbondioksit ve etanolünde (ve/veya asetik asit) ürettiği yoldur (Lombardi, 1999; Naidu, Bidlack ve Clemens, 1999; Çakır, 2003; Gismondo, Drago ve Tannock, 2004; Kao, Liu ve Shyu, 2007).

Homofermantatif yol ile glikozis yapan bakterilere genel olarak, bazı *Lactobacilli* üyeleri ile beraber, *Lactococci*, *Enterococci*, *Pediococci*, *Tetragenococci*, *Streptococci* ve *Vagococci* bakterilerin birçok türü örnek olarak verilebilirken, zorunlu heterofermantatif yolu kullanan LAB' lar ise *Leuconostoc*, bazı *Lactobacilli*, *Weissella* ve *Oenococci* türlerinin bulunduğu belirtilmiştir (Todar, 2013).



Görsel 2.1. LAB üyelerinin başlıca filogenetik grupları (Stiles ve Holzapfel 1997).

LAB' ların morfolojik ve gelişme özellikleri gibi belirleyici olduğu düşünülen özellikleri istisnaların olması ve LAB' ların çok değişken özelliklere sahip olmaları nedeniyle cinslerin tam olarak belirlemede yetersiz kalmaktadır. Bu sebeple günümüzde bakterilerin identifikasyonu için bakterilerin korunmuş olduğu düşünülen rRNA gen bölgeleri kullanılarak bakteriler suş düzeyinde tanımlanmaktadır.

2.3.3. *Laktobasillus* cinsi bakterilerin genel özellikleri

Laktobasillus cinsi bakteriler taksonomik olarak, *Firmicutes* filumu, *Bacilli* sınıfı, *Lactobacillales* ordosu, *Lactobacillaceae* familyasına aittir. *Lactobacillus* cinsinin fermentasyon özelliklerine göre geleneksel olarak 3 gruba ayrılan, 17 alt tür ve 175 tanımlanmış türü içermektedir. Bu gruplandırma ilk grup zorunlu homofermentatifler olup %85'e yakını son ürün olarak glukozdan laktik asit üretmektedirler. Genel olarak 45°C'de gelişme gösterir 15°C' de gelişemezler. İkinci grup olan fakültatif homofermentatifler, 15°C'de gelişebilirken, 45°C'de kısmen gelişme sergileyebilirler. Ortamda eğer O₂ bulunuyorsa, bu gruba giren *L. casei* ve *L. plantarum* gibi bakteriler daha okside olmuş asetat gibi maddeleri üretirler. Üçüncü grup olan zorunlu heterofermentatifler ise son ürün olarak laktik asidin ile birlikte CO₂ ve etanol de üretirler (Marsh, 1999; Salminen ve vd., 2004; Lalanne vd., 2012; Todar, 2013)

Homofermentatif laktobasiller; *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. delbrückii*, *L. salivarius* fakültatif homofermentatif laktobasiller; *L. curvatus*, *L. casei*, *L. plantarum* ve zorunlu heterofermentatif laktobasiller; *L. reuteri*, *L. buchneri*, *L. brevis*, *L. fermentum* gibi örnekleri içerisinde barındırırlar (Marsh, 1999; Salminen ve vd., 2004).

Bu geniş grupta morfolojik yapılarda da çeşitlilik görülmektedir. 2-5 mm arasında olan koloniler konveks, renksiz-sarımsı-beyaz ve opak olabilirken hücre morfolojisi genellikle uzun ya da kısa çubuk yapıсындаyken bazıları kokobasil veya kokoid şekilde olabilir. Bazı türlerinde ise hücre yapısı oldukça ince olabilmektedir. Ayrıca genç bakterilerin zincir oluşturamadıkları bilinmektedir (Holt vd., 1998; Ahi, 2011; Tokatlı, 2013).

Laktobasillerin en iyi geliştikleri sıcaklık 30-40°C arasında değişirken 70°C ve üstü yüksek sıcaklıklarda canlılıklarını kaybederler. Bu grubun üyeleri proteolitik ve lipolitik aktivite gösteremediklerinden, gelişim ortamlarında peptid, aminoasit, bazı vitaminler ve yağ asitlerine ihtiyaç duyarlar (Ljungh ve Wadström, 2006; Ahi, 2011; Tokatlı, 2013).

Su ve toprakta neredeyse hiç bulunmazlarken süt ve türevleri, fermente gıdalarda, bitkiler ve bitki atıklarında, canlıların bağırsak sistemlerinde bulunurlar. Probiyotik olan bazı *Lactobacillus* türlerinin asetik asit ve bakteriyosin gibi antimikrobiyal maddeler

ürettikleri ve bu sayede bağırsak mikroflorasının dengesini sağladığı bilinmektedir. Bunun yanında bazı laktobasil cinslerinin anti-kanser ve anti- inflamatuvar etkilerinin yanı sıra tedavi edici etki potansiyellerinin olduğu belirtilmiştir. Ayrıca bazı türlerinin streptomisin ve vankomisin gibi bazı antibiyotiklere dirençli olduğu da görülmüştür (Jalilsood vd., 2015; Jose vd., 2015, Salas-Jara vd., 2016; Ljungh ve Wadström, 2006).

2.4. Kolostrum, laktik asit bakterileri ve probiyotiklerin kısa tarihçesi

Tarihsel olarak kolostrum özellikle Hindistan'da Ayurvedik yaşamın manevi liderlerince binlerce yıl çeşitli hastalıkları tedavi etmede reçete edilmiş ve Ayurveda'da tıbbi öneminden sıkça bahsedilmiştir. Örneğin; bu Ayurveda belgelerinde sığır kolostrumunun gözün sulanması için göz ameliyatlarında kullanıldığı not edilmiştir. Eski Mısırlıların da göz enfeksiyonu tedavisinde kolostrum kullandıkları bildirilmektedir (Thapa, 2005; Buckley, 2002).

Kolostrumla ilgili ilk rasyonel analiz 1799 yılında Hufeland tarafından buzağuların sağlıklı ve hızlı büyümesi ile sığır kolostrumu tüketimi arasındaki ilişkiyi bildirmesiyle başlamıştır.

Probiyotiklerin varlığının ise insanların fermente gıdalar üretmeye başladığı yaklaşık 10.000 yıl öncesinde yani çiftçiliğin avcılığın ve toplayıcılığın yerini almasıyla birlikte olduğu varsayılmaktadır (Gasbarrini vd., 2016).

Tarihte uzun süredir yaygın olarak kullanımına birçok örnek bulunan LAB' ların dikkat çekmesi ise, 1847' de C. Blondeau' nun, laktik asidin bir mikroorganizmanın fermentasyon sürecinin bir ürünü olduğunu keşfetmesiyle başlamıştır. LAB' ların mikroskop altındaki ilk keşfi 1857 yılında Pasteur tarafından şaraplardaki ekşime çalışmasında, laktik asit üretimini mikroorganizmalara bağlamasıyla olmuştur. 1873 yılında Lister, LAB' ların saf suşunu elde etmek için laktatlı süttten ilk kez seri dilüsyon metodu kullanılarak *Lactococcus lactis*' i izole etmiştir (Axelsson, 2004).

LAB teriminin kullanımı ilk kez süttteki laktozdan fermentasyon yolu ile laktik asit oluşturan ve buna bağlı olarak sütü ekşitip çökelti oluşturan bakteri grubunu belirtmek amacıyla kullanılmıştır. LAB' ların sınıflandırılması ve doğru tanımlarından biri ilk olarak 1919 yılında Orla-Jensen tarafından yapılmıştır. Orla-Jensen sınıflandırmasını yaptığı LAB' ları morfolojik özellikleri (çubuk, kok, tetrad), glikozu

fermente etme şekli (homofermantatif, heterofermantatif), üredikleri sıcaklıklar (10 °C ve 45 °C) ve şeker kullanım şekilleri üzerinden yapmıştır (Orla- Jensen, 1919; Khalid, 2011).

Probiyotiklerin modern tarihi ise şöyle başlamaktadır. Nobel ödüllü Rus bilim adamı E. Metchnikoff' un Bulgar kırsal halkının uzun ömürlülüğünün fermente süt ürünlerini düzenli tüketmelerine bağlamasıyla başlamıştır. Buradan yola çıkarak laktobasillerin yaşlanmaya ve hastalıkta etkisi olan gastrointestinal sistemdeki çürütücü (proteolitik) mikroorganizmaların metabolizmadaki kötü etkilerine karşı koyabileceğini düşünmüş ve bu bakterilerin sütte fermentasyon yaparak pH'ı düşürmesi sonucunda bağırsaktaki proteolitik bakterilerin üremesini engellediğini düşünmüştür. "*Bulgaria bacillus*" adını verdiği bakterileri kendi beslenme alışkanlığında da uygulamıştır (Gasbarrini vd., 2016; Klein vd., 1998; Fuller, 1992).

Weller Kollath 1953 yılında probiyotik kelimesini "hayatın sağlıklı gelişimi için gerekli olan aktif maddeler" olarak tanımlamıştır. Lilly ve Stillwell tarafından 1965 yılında "bir organizma tarafından salgılanan ve diğerinin büyümesini teşvik eden" maddeleri tanımlamak için kullanılmıştır. Probiyotikler daha spesifik bir şekilde tanımlanması ise; Fuller tarafından 1992 yılında probiyotik tanımı; "konakçısı olduğu hayvanın bağırsak mikrobiyal dengesini düzenleyerek faydalı bir etki sağlayan canlı bir mikrobiyal yem takviyesi" olarak yapılmıştır (McFarland, 2015)

Kolostrumla ilgili, 1962 ve sonrasında yapılan çalışmalarda kolostrumun poliomyelite (çocuk felci) karşı antikorlar içerdiği öğrenilmiş ve hastalığa yakalanma ihtimali olan çocuklarda kullanılması önerilmiş ve daha sonrasında inek kolostrumundan çocuk felci antikorları izole edilerek geliştirilen aşının başarılı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca aşılanmış sığırların kolostrumundan rotavirüse karşı sabin aşısı yapılmıştır (Sabin ve Fieldsteel, 1962; Thapa, 2005; Pakkanen ve Aalto, 1997; Uruakpa, Ismond ve Akobundu, 2002).

Sığır kolostrumu antibiyotik çağından öncede bakteriyel enfeksiyonlara karşı yaygın olarak kullanılırken aynı zamanda doku onarımında da kullanıldığı bildirilmektedir. 2005 yılında sığır kolostrumunun doku onarımında güvenli olduğu ve bağışıklık oluşturmada da etkili olduğu rapor edilmiştir (Thapa, 2005).

Probiyotiklerin yüzyıllarca süren bir güvenli kullanım geçmişı vardır, ancak ekonomik değeri yirminci yüzyılda kabul edilmiştir. Küresel probiyotik pazarının 2022 yılında 57.8 milyar ABD Doları değerinde olacağı tahmin edilmektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kolostrum örneklerinin alınması ve laboratuvara getirilmesi

Kullanılan sığır kolostrum örnekleri; Afyonkarahisar ilinin, Sandıklı ilçesi, Reşadiye köyünden besi ve mera hayvancılığı yapan yetiştiricilerden temin edilmiştir. Doğum sonrasında ilk sağım dışarı atıldıktan sonra %70' lik alkole daldırılmış gazlı bezle meme başları steril edilmiştir. Sonrasında ilk kolostrum akıntısı atılmış ve steril falkon tüplere sağım yapılarak laboratuvara gelene dek -20 derecede saklanmıştır. Örnekler Holstein melezi olan 2 farklı sığırdan alınan kolostrumlardır. Çalışmada 1 ile başlayan kodlamadaki izolatlar 5 yaşında ve 3. doğumu olan sığırdan 2 ile başlayanlar ise 4 yaşında ve 2. doğumu olan sığırdan izole edilmiştir. Örnekler laboratuvara getirildikten sonra hemen 15' lik falkon tüplere bölünüp -20°C' de çalışma yapılincaya dek saklanmıştır.

3.1.2. Hücre hattı

Çalışmamızda kullanılan kanser hücre hattı, insan kolorektal adenokarsinoma hücre hattı olan Caco-2, (ATCC kodu: HTB-37) ATCC (American Tissue Culture Collection)' den sağlanmıştır. Caco-2 hücre hattı; kolorektal adenokarsinoma sahip 72 yaşında, Kafkas, erkek bireyin epitelyal kolon dokusundan kültüre edilmiştir. Hücre hattı adhere hücre özelliğine sahiptir. (http-1)

3.1.3. Standart bakteri suşları

Çalışmalarda kullanılan standart bakteri suşları Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı koleksiyonundan temin edilmiştir. Bu mikroorganizma kültürleri Çizelge 3.1.' de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan standart bakteri suşları

Tür Adı	ATCC Kod Numarası
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35298
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644

Çizelge 3.1. (Devam) Kullanılan standart bakteri suşları

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC B-4420
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 51299
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 15245
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778

-80°C’ de gliserol içerisinde stok halde bulunan bakteri kültürleri Nutrient Broth (NB) besiyerinde, 37°C’ de 24 saatlik inkübasyon sonunda aktiflenmiştir ve gerekli çalışmalarda kullanılmıştır.

3.1.4. Besi ortamları

3.1.4.1. MRS broth (*Lactobacillus Agar acc. to De Man, Rogosa and Sharpe*)

Çizelge 3.2. MRS broth içeriği

Malzeme	g/L
Diamonyum hidrojen sitrat (K ₂ HPO ₄)	2 g
Glukoz	20 g
Magnezyum sülfat (MgSO ₄)	0.2 g
Mangan sülfat (MnSO ₄)	0.05 g
Et ekstraktı	10 g
Pepton	10 g
Sodyum asetat	5 g
Maya ekstraktı	5 g
Amonyum sitrat	2 g
Tween 80	1 mL
Distile su	1000 mL

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.4.2. MRS broth %6 tuz ilaveli

Daha önce içeriği 3.1.4.1.’ de verilmiş olan MRS broth (Biolife) ortamı içerisine 60g/1000 mL olacak şekilde sodyum klorür ilave edilmiş ve distile suda çözülmüştür.

pH'ı 7.0 ± 0.2 şeklinde ayarlandıktan sonra 121°C ' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.4.3. MRS broth %7.5 tuz ilaveli

Daha önce içeriği 3.1.4.1.' de verilmiş olan MRS broth (Biolife) ortamı içerisine 75g/1000 mL olacak şekilde sodyum klorür ilave edilmiş ve distile suda çözülmüştür. pH'ı 7.0 ± 0.2 şeklinde ayarlandıktan sonra 121°C ' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.4.4. MRS broth %10 tuz ilaveli

Daha önce içeriği 3.1.4.1.' de verilmiş olan MRS broth (Biolife) ortamı içerisine 100g/1000 mL olacak şekilde sodyum klorür ilave edilmiş ve distile suda çözülmüştür. pH'ı 7.0 ± 0.2 şeklinde ayarlandıktan sonra 121°C ' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.4.5. MRS broth %0.3 safra tuzu (Ox gall) ilaveli

Daha önce içeriği 3.1.4.1.' de verilmiş olan MRS broth (Biolife) ortamı içerisine %0.3 g olacak şekilde safra tuzu (Ox gall Sigma, B3883) ilave edilmiş ve distile suda çözülmüştür. pH'ı 7.0 ± 0.2 şeklinde ayarlandıktan sonra 121°C ' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.4.6. MRS broth %0.6 safra tuzu ilaveli safra tuzu (Ox gall, Sigma, B3883) ilaveli

Daha önce içeriği 3.1.4.1.' de verilmiş olan MRS broth (Biolife) ortamı içerisine %0.6 g olacak şekilde safra tuzu (Ox gall) ilave edilmiş ve distile suda çözülmüştür. pH'ı 7.0 ± 0.2 şeklinde ayarlandıktan sonra 121°C ' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.4.7. pH:2, pH:3 ve pH 3.9 MRS broth ortamı

İçeriği 3.1.4.1.' de verilmiş olan MRS broth (Biolife) besiyeri distile su içerisinde çözüldükten sonra içerisine istenilen pH seviyesine ulaşınca dek 1 M HCl yavaş yavaş ilave edilmiş ve 121°C ' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.4.8. pH:9.6 MRS broth ortamı

İçeriği 3.1.4.1.' de verilmiş olan MRS broth (Biolife) besiyeri distile su içerisinde çözüldükten sonra içerisine istenilen pH: 9.6 seviyesine ulaşınca dek 1 M NaOH yavaş yavaş ilave edilmiş ve 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.4.9. MRS broth%0.25 glikoz ilaveli

Daha önce içeriği 3.1.4.1.' de verilmiş olan MRS broth (Biolife) ortamı içerisine %0.25 olacak şekilde glikoz ilave edilmiş ve distile suda çözülmüştür. pH'ı 7.0 ± 0.2 şeklinde ayarlandıktan sonra 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Biyofilm oluşumu deneyinde kullanılmıştır.

3.1.4.10. MRS agar (*Lactobacillus Agar acc. to De Man, Rogosa and Sharpe*)

Çizelge 3.3. MRS agar içeriği

Malzeme	g/L
Diamonyum hidrojen sitrat (K_2HPO_4)	2 g
Glukoz	20 g
Magnezyum sülfat ($MgSO_4$)	0.2 g
Mangan sülfat ($MnSO_4$)	0.05 g
Et ekstraktı	10 g
Pepton	10 g
Sodyum asetat	5 g
Maya ekstraktı	5 g
Amonyum sitrat	2 g
Agar	14 g
Tween 80	1 mL
Distile su	1000 mL

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.4.11. Nutrient broth (LABM, Neogen)

Çizelge 3.4. Nutrient broth içeriği

Malzeme	g/L
Et ekstraktı	1 g
Pepton	5 g
Sodyum klorür (NaCl)	5 g
Maya ekstraktı	2 g

3.1.4.12. Nutrient agar

Çizelge 3.5. Nutrient agar içeriği

Malzeme	g/L
Et ekstraktı	1 g
Pepton	5 g
Sodyum klorür (NaCl)	5 g
Maya ekstraktı	2 g
Agar	14 g

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.4.13. Mueller hinton broth (Biolife)

Çizelge 3.6. Mueller hinton broth içeriği

Malzeme	g/L
Et ekstraktı	2 g
Kazein hidrolizatı	17.5 g
Nişasta	1.5 g

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Yapılan çalışmalarda MHB çift kuvvet hazırlandığından 1000 mL distile su içerisinde toplam madde hacmi 42 g olacak şekilde hazırlanmıştır. Mikrodilüsyon broth deneylerinde kullanılmıştır.

3.1.4.14. Mueller hinton agar

Çizelge 3.7. Mueller hinton agar içeriği

Malzeme	g/L
Et ekstraktı	2 g
Kazein hidrolizatı	17.5 g
Nişasta	1.5 g
Agar	14 g

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra 121°C’ de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Yapılan çalışmalarda MHB çift kuvvet hazırlandığından 1000 mL distile su içerisinde toplam MHB hacmi 42 g üzerine 14 g agar olacak şekilde hazırlanmıştır. Agar disk difüzyon testinde kullanılmıştır.

3.1.4.15. Üç Şekerli- Demir (TSI) agar

Çizelge 3.8. TSI agar içeriği

Malzeme	g/L
Pepton (kazeinden)	15 g
Pepton (etten)	5 g
Et ekstraktı	3 g
Maya ekstraktı	3 g
Sodyum klorür	5 g
Laktoz	10 g
Sukroz	10 g
D (+) Glukoz	1 g
Demir (III) amonyum sitrat	0.5 g
Sodyum tiosülfat	0.5 g
Fenol kırmızısı	0.024 g
Agar	12 g

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH 7.4±0.2’ye ayarlanmıştır. İçeriğin tam olarak homojen hale getirilmesi için besiyeri kaynatılmış ve test tüplerine 15 mL koyularak 121°C’ de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Otoklavdan çıkan tüpler eğimli bir zemin üzerine yatırılarak dondurulmuş ve yatık agar şeklinde kullanılmıştır. Hareketlilik, farklı şekerleri kullanabilme ve gaz oluşumu testlerinde kullanılmıştır.

3.1.4.16. Kanlı agar

Hemolitik aktivite tayini için kullanılmıştır.

3.1.4.17. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan besiyeri

Çizelge 3.9. Caco-2 hücre hattı besiyeri içeriği

Malzeme	mL
DMEM	89mL
Fötal sığır serumu	10 mL
Penisilin-streptomisin çözeltisi	1 mL

Steril olan besiyeri bileşenleri steril kabinde biraraya getirilmiş ve besiyeri +4°C’ de buzdolabında saklanmıştır. Bu besiyeri Caco-2 kanser hücre hattının üretilmesinde kullanılmıştır.

Çizelge 3.10. Caco-2 hücre hattı besiyeri malzeme ve markaları

Malzeme	Marka
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, Almanya
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich, Almanya
Penisilin-streptomisin Solüsyonu (10.000 U/mL Penicillin / 10 mg/mL Streptomycin)	PAN, Almanya

3.1.5. Kullanılan cihaz ve gereçler

Çizelge 3.11. Kullanılan gereç-cihaz ve markaları

Cihaz/Gereç	Marka
Thermo Flask, Filtreli Kapak (75 cm ²)	Thermo Scientific, ABD
Thermo Flask, Filtreli Kapak (25 cm ²)	Thermo Scientific, ABD
2 mL'lik Ependorf tüp	Greiner bio-one, ABD
5-10 ve 25 mL'lik pipet	Isotherm, Türkiye
Cedex Smart Slide	Roche, Almanya
Kryotüp (2mL)	Greiner Bio-One, ABD
Hücre kazıyıcı	Greiner Bio-One, ABD

Çizelge 3.11.(Devam) Kullanılan gereç-cihaz ve markaları

Şarjlı pipetör	Starlab, Almanya
6, 24, 48 ve 96 kuyucuklu hücre kültür plakası	TPP, İsviçre
10, 100, 1000 ve 5000 µL'lik otomatik pipet	Eppendorf, Kanada
10, 200, 1000 µL'lik mikropipet ucu	Greiner bio-one, ABD
12 kanallı otomatik pipet	Axygen, İngiltere
15 ve 50 mL'lik santrifüj tüpleri	Isolab, Almanya
Laminer flow kabini	Heal Force, Çin
Masaüstü soğutmalı santrifüj	Eppendorf, Almanya
Hücre sayımı için Cedex XS	Innovatis, ABD
Cytation 3 Multi-Mode Reader	Bio-Tek, ABD
Derin dondurucu buzdolabı	Altus, Türkiye
Hassas terazi	Ohaus, Avustralya
Inverted mikroskop	Leica, Almanya
Otoklav	Alp, Türkiye
Otomatik pipetler	Eppendorf, Almanya
Su banyosu	Nüve, Türkiye
Vorteks	Daihan, Güney Kore
Akış sitometri cihazı	BD Accuri C6, ABD
Annexin V and PI Apoptosis Kit	Biotium, ABD

3.1.6. Kullanılan malzemelerin steril edilmesi

Kullanılan sıvılar, falkonlar, şişeler, rezervuarlar, tüpler ve mikrobiyolojide kullanılan besiyerleri uygun şekilde alüminyum folyo ile sarılarak otoklavda 121°C, 1.5 atmosfer basınçta 15 dakika steril edilmiştir.

3.1.7. Kullanılan çözeltiler kimyasallar ve boyalar

3.1.7.1 %20' lik gliserol çözeltisi

80 mL distile su ile 20 mL gliserol çözüldükten sonra 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra kullanılmıştır. İzolatların ve test bakterilerinin - 80°C'de stoklanmasında kullanılmıştır.

3.1.7.2. %0.9' luk fizyolojik tuzlu su

0.9 g sodyum klorür (NaOH) 100 mL distile su içerisinde çözülmüş ve 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra kullanılmıştır.

3.1.7.3. %3' lük hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltisi

0.1 mL saf (%35) hidrojen peroksit alınıp distile su ilavesi ile 30 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra bu çözeltiden 1 mL başka bir erlene alınmış ve tekrar distile su ile 30 mL'ye tamamlanmıştır

3.1.7.4. 0.1 M NaOH ve 0.1 M HCl çözeltisi

40 g Sodyum hidroksit (NaOH) 100 mL distile su içerisinde çözülmüş olup laktik asit tayini ve pH ayarlaması için kullanılmıştır.

3.6 g Hidrojen klorür (HCl) 100 mL distile su içerisinde çözülmüş olup pH ayarlaması için kullanılmıştır.

3.1.7.5. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) çözeltisi

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikali (Sigma) 5 mg tartılıp 250 mL metanolde çözülmüştür. Tamamen çözünmesini sağlamak için 15 dk ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Çalışma süresince karanlıkta saklanmıştır. Her çalışmadan önce taze hazırlanmıştır. Antioksidan aktivite testinde kullanılmıştır.

3.1.7.6. BHT (butilhidroksitoluen) çözeltisi

5 mg BHT (butilhidroksitoluen) tartılıp 5 mL metanol içerisinde çözülür. Üzerine 5 mL distile su ilave edilir. Bu çözeltiden 300 µl alınarak 5 mL distile su ile çözülür. Antioksidan deneyinde referans madde olarak kullanılır.

3.1.7.7. MTT(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) çözeltisi

0.5 g 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (Sigma) tartılıp 100 mL fosfat tamponu içinde çözülmüştür. Hazırlanan bu stok çözelti -20°C' de

saklanmıştır. Stok çözelti 1/10 oranında seyreltilerek kullanılmıştır. Çözelti her çalışmadan önce taze hazırlanmıştır. Sitotoksik aktivite testlerinde kullanılmıştır (Mossman, 1983).

3.1.7.8. Kullanılan kimyasallar ve boyalar

Çizelge 3.12. *Kullanılan kimyasallar, boyalar ve markaları*

Malzeme	Marka
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma–Aldrich, Almanya
Tripsin-EDTA 10X	Pan Biotech, Almanya
Tripan mavisi	Roche, Almanya
Phenolphthalein solution	Sigma–Aldrich, Almanya
Phosphate Buffer Saline (PBS)	Invitrogen, Almanya
Gram Boyama Seti	Norateks, Türkiye

3.1.8. Kullanılan antibiyotikler

Çizelge 3.13. *Kullanılan antibiyotikler ve markaları*

Antibiyotik	Marka
Aminopenisilin G	Sigma–Aldrich, Almanya
Novobiosin	LAB M, ABD
Kloramfenikol	Sigma–Aldrich, Almanya
Ampisilin	Sigma–Aldrich, Almanya
Sefamezin	Zentiva
Siproflaksasin	Sigma–Aldrich, Almanya
Sephalotin C4520	Sigma–Aldrich, Almanya
Nifuroksazid	Sigma–Aldrich, Almanya
Streptomisin 56501	Sigma–Aldrich, Almanya
Penislin G	Sigma–Aldrich, Almanya
Kanamisin sülfat 8324	ROTH, ABD
Eritromisin A2275	Applichem, Almanya
Vankomisin	Applichem, Almanya
Eritromisin E6376	Sigma–Aldrich, Almanya

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Kolostrum örneklerinden mikroorganizma izolasyonu

Her örnekten iki farklı izolasyon gerçekleştirilmiştir. İlk izolasyon için direkt - 20°C'den alınan sığır kolostrumları, ikincisi için ise; 21 gün inkübatörde fermente edilmiş kolostrumlar izolasyon için kullanılmıştır. Ardından 1, 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/16 olacak şekilde 5 farklı dilüsyon hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonlardan 500 µl alınarak steril drigalski spatülü ile MRS agar besiyerine yayma ekim yapılmıştır. Aerob koşullarda 37°C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından üreme olup olmadığı kontrol edilmiş ve morfolojik olarak farklı görünen kolonilerden steril öze yardımıyla birer koloni alınarak MRS agar besiyerine tek koloni ekimi yapılmıştır. Aerob koşullarda 37°C'de inkübasyona bırakılmış ve saf kültürler elde edilmiştir.

3.2.2. İzolatların tanımlanması

İzole edilen mikroorganizmalara ön eleme olarak önce katalaz testi ve daha sonra gram boyama testleri uygulanmıştır. Katalaz negatif ve gram pozitif (+) olan çubuk şekilli bakteriler laktik asit bakterisi olarak ayrılmış ve çalışmalara bu mikroorganizmalarla devam edilmiştir.

3.2.2.1 Katalaz Testi

Bu test katalaz enziminin ortamdaki H₂O₂' yi (hidrojen peroksit) oksijen ve suya ayırması temeline dayanmaktadır. Test sonucu birkaç dakika içerisinde gözlemlenerek elde edilmektedir. MRS agar ortamında geliştirilen gecelik kültürlerden bir öze dolusu örnek alınarak temiz bir lam yüzeyine aktarılmıştır. Üzerine birkaç damla %3' lük H₂O₂ damlatılarak kabarcık oluşumu gözlenmiştir. Kabarcıkların oluşması katalaz enziminin varlığını göstermektedir (Hammes ve Vogel 1995).

Sonuçta kabarcık oluşturan örnekler katalaz pozitif (+), reaksiyon gözlenmeyenler ise katalaz negatif (-) olarak değerlendirilmiştir. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bakterisi test için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Akçelik vd., 2000).

Test sonucunda negatif olarak değerlendirilen örnekler Laktik asit bakterisi (LAB) olarak kabul edilmiştir. Deneylere katalaz negatif izolatlarla devam edilmiştir (Özteber, 2013).

3.2.2.2. *Gram Boyama*

Diferansiyel bir boyama tekniği olan gram boyama; 1884 yılında Christian Gram tarafından geliştirilmiştir. Gram boyama temelde bakterilerin hücre duvarı yapısından kaynaklanan geçirgenlik farkını kullanarak bakterilerin iki gruba ayrılmasını sağlar (Tamer vd., 1989).

Boyama işleminde morfolojik olarak saf olan izolatlar MRS agar ortamında çizgi ekimi ile tekrar aktiflenmiştir. Gecelik kültürlerin gram boyanma özelliğini belirlenmek için lam üzerine bir damla su damlatıldıktan sonra öze ile az miktarda alınan kültür emülsifiye edilerek lam yüzeyine yayılmıştır. Lam ilk olarak havada kurutulduktan sonra bek alevinden geçirilerek fikse edilmiştir. Boyama işleminde preparat üzerine ilk olarak kristal viyole damlatılarak 1 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda preparat üzerindeki fazla boya akıtılarak distile su ile yıkanmış ve preparat yüzeyine lügol çözeltisi eklenmiş ve bir dakika beklemeye bırakılmıştır. Süre sonunda preparat distile su ile yıkanmış ve dekolarizasyon için 30 saniye %95' lik alkol ile muamele edilmiştir. Süre sonunda distile su ile yıkanmıştır ve son olarak safranin ile boyanıp 1 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda preparat suyla yıkanıp, kurutma kağıdıyla kurutulmuştur. Daha sonra hazırlanan preparatlar immersiyon yağı kullanılarak x100' lük objektifte ışık mikroskopunda renk ve morfolojilerine göre incelenmiştir. Gözlem sonrasında mor renge boyananlar gram pozitif (+), pembe renkte olanlar ise gram negatif (-) olarak değerlendirilmiştir (Tamer vd., 1989).

3.2.2.3. *TSI agar testi*

Üç şekerli demir agar (TSI) ortamının kullanıldığı bu test bakterilerin kükürt içeren aminoasitlerden ya da sülfatlardan hidrojen sülfür (H₂S) oluşturup oluşturmadıklarını belirlerken aynı zamanda şeker kullanımı ve glikozdan gaz oluşturulması hakkında da sonuç almamızı sağlayan bir besi ortamıdır.

Test için MRS agar ortamında gecelik kültür hazırlanmıştır Gecelik kültürden alınan örnekler yatık TSI agar ortamına iđne öze ile dik ekim ve aynı zamanda da yuvarlak uçlu öze ile yatık agar yüzeyine çizgi ekim yapılmıştır. Kùltürler, 1-7 gün 37°C 'de inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonucunda dipte siyah renk oluşumu H₂S açısından pozitif (+) olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kültürlerde bakterilerin ürettiği H₂S besi ortamında bulunan demir ile birleşince siyah renk meydana gelmektedir. Bunun yanı sıra besi ortamındaki renk değişiminin olması, mikroorganizmaların sakkaroz, laktoz şekerlerini kullandığını gösterirken, besi ortamının tüp dibinden yüzeye doğru itilmiş olması glikozdan gaz oluşumunu göstermektedir (Halkman, 2005).

3.2.2.4. Hemolitik aktivite tayini

İzolatların hemolitik aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla, MRS broth besiyerinde geliştirilen gecelik kültürlerden kanlı agar ortamına tek koloni ekimi yapılmıştır. *Escherichia coli* bakterisi kontrol olarak kullanılmıştır. 37°C 'de ortamda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda parlak yeşil zon oluşumu α-hemolitik, berrak zon oluşumu β-hemolitik, zon oluşturmayanlar ise γ-hemolitik olarak değerlendirilmiştir (Maragkoudakis ve vd., 2006).

3.2.2.5. Biyofilm oluşumu

Biyofilm oluşumunun belirlenmesi için modifiye edilmiş mikrolaka yöntemi kullanılmıştır (Stepanovic vd., 2007). MRS broth besi ortamında geliştirilen LAB izolatlarından gecelik kültür hazırlanmıştır. %0.25 glikoz eklenmiş MRS besiyerinde McFarland 0.5 (10⁸ kob/mL) bulanıklığa ayarlandıktan sonra 10 kat (1/10) seyreltme yapılarak bakteri yoğunluğu 10⁷ kob/mL olarak ayarlanmıştır. Bu hazırlanan bakteri örneğinden 96 kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğuna 200 µl dağıtılmıştır. Pozitif kontrol olarak *E. coli* ATCC 35218 ve *E. faecalis* ATCC 51299 kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise; %0.25 glikoz eklenmiş MRS broth kullanılmıştır. Mikrolakalar 48 saat 37°C 'de inkübe edilmiştir. 48 saat sonunda mikrolakalar, 200 µl PBS ile 2-3 kez yıkanmış ve ters çevrilerek tamamen kurutulmuştur. Biyofilm oluşturan bakterileri fikse etmek amacıyla 150 µl metanol ilave edilerek 20 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda ters çevrilerek boşaltılıp oda sıcaklığında kurutulmuştur. Üzerine %0.1' lik kristal viyole çözeltisinden 150 µl eklenerek 15 dakika boyunca biyofilm oluşturan bakterilerin boyanması sağlanmıştır. Süre sonunda mikrolaka musluk suyu ile yıkanmış ve kurutulmuştur. Spektrofotometrede ölçüm yapılmadan 30 dakika önce kuyucuklara 150 µl %95' lik etanol eklenmiştir. Süre sonunda mikrolaka 570 nm dalga boyunda Cytation3 ELISA okuyucuda okunmuş ve sonuçlar; dansite değerlerine göre negatif,

zayıf, orta veya pozitif olarak değerlendirilmiştir. Deney birbirinden bağımsız zamanlarda 3 tekrar olarak çalışılmıştır.

3.2.3. LAB izolatlarının probiyotik özelliklerinin belirlenmesi

3.2.3.1. Asit direncinin belirlenmesi

LAB izolatlarının aside dirençlerini belirlemek amacıyla 2 kez MRS broth besi ortamına %1' lik ekim yapılmış ve 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 1M HCl ile pH; 2 ve 3' ayarlanmış MRS broth ve kontrol ortamına %1'lik ekim gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak MRS broth besi ortamı kullanılmıştır. Farklı pH ve kontrol grubuna yapılan ekimlerden 0., 1., 2. ve 4. saatlerde, bir öze dolusu örnek alınarak petrilere ekim yapılmıştır. Ekimi yapılan petrilere 37°C' de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda üremeleri gözlenmiştir (Claire vd., 2006).

3.2.3.2. Safra tuzu direncinin belirlenmesi

LAB izolatlarının safra tuzuna dirençlerini belirlemek amacıyla 2 kez MRS broth ortamına %1'lik ekim yapılmış ve 37°C' de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, %0.03, %0.1, %0.3 ve %0.6 safra tuzu içeren MRS broth ve kontrol besi ortamına %1'lik ekim gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak normal MRS broth besi ortamı kullanılmıştır. Farklı safra tuzu ve kontrol grubuna yapılan ekimlerden 0., 1., 2. ve 4. saatlerde bir öze dolusu alınarak örnek alınarak petrilere ekim yapılmıştır. Ekimi yapılan petrilere 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda üremeleri gözlenmiştir (Pereira ve Gibson, 2002).

3.2.3.3. Otoagregasyon özelliklerinin belirlenmesi

LAB' ların % otoagregasyon özelliklerinin belirlenmesi Kos vd (2003) uyguladığı metod modifiye edilerek uygulanmıştır. Kullanılacak LAB izolatları MRS broth besiyerinde 37°C' de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında falkonlara alınarak 10000 rpm' de 15 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kalan pellet 2 kez yıkanmıştır. İlk yıkama pH' sı 6.2 ye ayarlanmış PBS ile yapıldıktan sonra ikinci yıkama pH' sı 7.0 olan PBS ile yapılmıştır. PBS tamponu içerisinde çözülmüştür. Elde edilen çözelti optik dansite (OD) 600 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede ölçüldükten sonra oda sıcaklığında 4 saat boyunca bekletilmiştir. 4

saat sonunda çözeltinin üst kısmından 0.1 mL alınarak OD 600 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede okunmuştur. Aşağıdaki denkleme göre suşların otoagregasyon yüzdeleri hesaplanmıştır.

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

[OD1: İlk optikal yoğunluk; OD2: 4 saat sonraki optikal yoğunluk].

3.2.3.4. Koagregasyon özelliklerinin belirlenmesi

LAB suşlarının *E. coli* ATCC 25922 ve *S. aureus* ATCC 25923 ile koagregasyon özelliklerinin belirlenmesi için Rinkinen vd (2003)'nin metodu modifiye edilerek uygulanmıştır. Kullanılacak LAB izolatları MRS broth besiyerinde 37°C' de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında falkonlara alınarak 5000 rpm' de 15 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kalan pellet 2 kez pH' sı 6.2 ye ayarlanmış PBS ile yıkanmış ve bu tampon içerisinde çözülmüştür. Her bakteri örneği optik dansite (OD) 600 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede ölçülmüştür. Daha sonra LAB kültürü ve test bakterisinden eşit miktarda örnek alınarak aynı tüp içinde 10-15 saniye vortex ile karıştırılmış ve daha sonra oda sıcaklığında 4 saat bekletilmiştir. 4 saat sonunda çözeltinin üst kısmından 0.1 mL alınarak OD 600 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede okunmuştur. Aşağıdaki denkleme göre suşların koagregasyon yüzdeleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Koagregasyon} = \frac{(OD1+OD2) - (2OD3)}{OD1+OD2} \times 100 \quad (3.2)$$

[OD1: Bakteri kültürlerinin optikal yoğunluğu; OD2: Test bakterilerinin optikal yoğunluğu; OD3: Karışık kültürün 4 saat sonundaki optikal yoğunluğu].

3.2.3.6. Antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi

Antibiyotik duyarlılığını belirlemek için mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. 14 farklı antibiyotikten 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 ve 64 µg/mL olacak şekilde 8 farklı konsantrasyon hazırlanmıştır. Kullanılan antibiyotikler aminopenisilin G, novobiosin, kloramfenikol, ampisilin, sefamezin, siproflaksasin, sephalotin C4520, nifuroksazid, streptomisin 56501, penisilin G, kanamisin sülfat 8324, eritromisin A2275, vankomisin, eritromisin E6376'dır.

LAB izolatlarından MRS broth besiyerinde gecelik kültürler oluşturulmuştur. Gecelik kültürlerden alınan örnekler %0.9' luk fizyolojik tuzlu su içerisinde McFarland 0.5 (10⁸kob/mL) bulanıklığa ayarlandıktan sonra 1/10 oranında MRS broth ortamında seyreltilmiştir. Bu şekilde hazırlanan her örnek 96 kuyucuklu plakaların her kuyucuğuna 100 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Pozitif kontrol olarak *E. coli* 35218 kullanılmıştır. *E. coli* için MHB besiyeri kullanılmıştır. Deneyler çift tekrarlı olarak yapılmıştır. Plakalar 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.2.3.7. Laktik asit üretimi tayini

Laktik asit üretim miktarlarını tayin etmek için LAB izolatlarından MRS broth ortamına ekim yapılarak 48 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Bu kültürlerden tekrardan MRS broth ortamına %1' lik olacak şekilde ekim yapılmıştır. İkinci inkübasyondan sonra LAB kültürlerinden 1 mL temiz bir erlene alınıp, 99 mL steril distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Üzerine fenol fitalein indikatöründen 2-3 damla damlatılmıştır. Ardından 0,1 M NaOH çözeltisi ile titrasyon yapılmıştır. Harcanan NaOH miktarları hesaplama için kaydedilmiştir. Kültürlerin ürettiği asit miktarı, titre edilebilir yüzde asit olarak hesaplanmıştır. Hesaplamalar aşağıdaki denkleme göre yapılmıştır. Çalışma çift paralel olarak yapılmıştır (Demirci ve Gündüz, 1994).

$$\% \text{Asitlik} = \text{Harcanan } 0,1 \text{ NaOH (mL)} \times 0,9/\text{mL} \quad (3.3)$$

3.2.3.8. Antimikrobiyal aktivite tayini

Antimikrobiyal aktivite tayini için agar kuyucuk difüzyon metodu ve mikrodilüsyon broth yöntemleri kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan test bakteri suşları; *L. monocytogenes* ATCC 7644, *B. subtilis* ATCC15245, *B. cereus* ATCC 11778, *S. typhimurium* ATCC B-4420, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 51299, *P. aeruginosa* ATCC 27853'dir.

LAB izolatları; MRS broth ortamına ekim yapılarak 37°C'de 18-24 saat inkübe edilmiş ve aktif kültürler elde edilmiştir. Bu kültürlerden tekrar MRS broth ortamına %1' lik ekim yapılarak 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Aktif kültürler antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılmıştır.

3.2.3.8.1. Agar kuyucuk difüzyon metodu

Kullanılacak olan test bakterilerinden gecelik kültür oluşturmak için Nutrient broth ortamına ekim yapılarak 37°C’de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında test bakterileri %0.9’ luk fizyolojik tuzlu su içerisinde McFarland 0.5 (10⁸ kob/mL) bulanıklığa ayarlanmıştır. 100 µl alınarak Muller-Hinton agar (MHA) besiyerinin çift kuvvet olacak şekilde hazırlanmış olan petrilere drigalski spatülü ile eşit olacak şekilde yayma ekim yapılmıştır. Oda sıcaklığında yüzeyi hafif kuruyan petrilere 3 mm çapında kuyular açılmıştır.

McFarland’ı 0.5 (10⁸ kob/mL) bulanıklığa ayarlanan LAB izolatlarından 100 µl alınarak her kuyucuğa koyulmuştur. Kontrol olarak her bir test bakterisinde bir kuyucuk kloramfenikol koyulmuştur. İnkübatörde 1 saat düz bir şekilde tutulduktan sonra ters çevrilen petrilere 37°C’de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petrilereki inhibisyon zon çapları kumpas yardımı ile ölçülüp kayıt edilmiştir (Ertekin ve Çon, 2014).

3.2.3.8.2. Mikrobroth dilüsyon metodu

MRS agar besiyerinde geliştirilen LAB ‘lardan tek koloni alınarak MRS broth ortamına %1’ lik ekim yapılarak 37°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 10000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucunda elde edilen süpernatant steril şartlar altında 0.22 µm’lik tek kullanımlık steril filtre ile mikrofiltrasyon yolu ile sterilize edilmiştir. Sterilize edilen süpernatantlarda mikroorganizma varlığının kontrolü için besiyerlerine ekimler yapılmıştır. Yukarıda belirtildiği şekilde ekimleri yapılan LAB izolatlarının süpernatantları liyofilize edilmiş ve postbiyotik olarak antimikrobiyal aktiviteleri karşılaştırılmıştır.

Mikrodilüsyon broth yönteminde postbiyotiklerin kullanıldığı örnekler steril distile su içerisinde çözülmüş, 25, 20, 15, 10 ve 5 mg madde taşıyacak şekilde dilüye edilmiş konsantrasyonları kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan kloramfenikol konsantrasyonları 25, 20, 15, 10 ve 5 µg olacak şekilde ayarlanmıştır.

Kullanılacak olan test bakterileri gecelik kültür oluşturmak için Nutrient broth ortamına ekim yapılarak 37°C’de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında test bakterileri %0.9’ luk fizyolojik tuzlu su içerisinde McFarland 0.5 (10⁸

kob/mL) bulanıklığa ayarlanmıştır. Çift kuvvet olarak hazırlanmış MHB ortamına fizyolojik tuzlu su içerisinde McFarland 0.5 (10^8 kob/mL) bulanıklığa ayarlanmış olan test bakterilerinden 1/10 olacak şekilde seyreltme yapılmıştır. Bu şekilde hazırlanan her bir bakteri 96 kuyucuklu plakalara dağıtılmıştır.

Yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan postbiyotik örnekleri her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde koyulmuştur. Pozitif kontrol olarak kloramfenikol kullanılmış ve negatif kontrol olarak ise; madde içermeyen sadece test bakterisinin bulunduğu kuyucuklar bulunmaktadır.

Plakalar 24 saat 37°C ' de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyucuklarda üreme olup olmadığı gözlenmiştir. Üremenin olmadığı en son kuyucuktaki konsantrasyon Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değeri olarak belirlenmiştir (NCCLS, 2006).

3.2.3.9. LAB postbiyotiklerinin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi

Antioksidan aktivitenin belirlenmesi için DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki testi kullanılmıştır. Bunun için LAB izolatları %1' lik ekim yapılarak 37°C 'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında kültürler steril falkonlara aktararak 10000 rpm' de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant steril falkona aktarılmıştır. Yukarıda belirtildiği şekilde ekimleri yapılan LAB izolatlarının süpernatantları liyofilize edilmiş ve serbest radikal süpürücü etkilerine bakılmıştır.

Elde edilen postbiyotiklerin, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikali (DPPH) üzerindeki serbest radikal süpürücü etkileri Sanchez-Moreno ve arkadaşları (1998) tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. 50 µl, 100 mg/mL konsantrasyonda olan postbiyotik örnekleri ve 50 µl BHT (pozitif kontrol) üzerine ayrı ayrı 3 mL DPPH (2×10^{-2} g/L) çözeltisi ilave edilerek 30 saniye vortekslenmiştir. Karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 517 nm dalga boyuna ayarlanmış spektrofotometrede absorbans değerleri okunmuştur. % inhibisyon olarak serbest radikal süpürücü etki (Antioksidan indeks) aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır (Öztürk vd., 2007). Her test 3 kez tekrarlanarak ortalamaları alınmıştır ve referans madde olarak BHT (butilhidroksitoluen) kullanılmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Kontrol absorbansı} - \text{Örneğin absorbansı}}{\text{Kontrol absorbansı}} \times 100 \quad (3.4)$$

3.2.5. Hücre kültürü çalışmaları

3.2.5.1. Hücre kültürü çalışmaları için LAB postbiyotiklerinin hazırlanması

MRS agar besiyerinde geliştirilen LAB 'lardan tek koloni alınarak MRS broth ortamına ekim yapılarak 37°C'de 18-24 saat inkübe edilerek aktif kültürler elde edilmiştir. Bu kültürlerden tekrar MRS broth ortamına %1' lik ekim yapılarak 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 10000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucunda elde edilen süpernatant steril şartlar altında 0.22 µm'lik tek kullanımlık steril filtre ile mikrofiltrasyon yolu ile sterilize edilmiştir. Sterilize edilen süpernatantlarda mikroorganizma varlığının kontrolü için besiyerlerine tekrar ekimler yapılmıştır.

Yukarıda belirtildiği şekilde ekimleri yapılan LAB izolatlarının süpernatantları liyofilize edilmiş ve postbiyotik olarak hücre kültürü çalışmalarında örnek olarak kullanılmıştır.

3.2.5.2. Caco-2 (Kolorektal adenokarsinom hücre hattı) hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması

Caco-2 (ATCC HTB-37) hücre hattının kültür ortamında geliştirilmesi için %10 FBS (fötal sığır serumu), %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM besiyeri kullanılmıştır. Hücreler flask içerisinde %95 bağıl nem ve %5 CO₂ ve 37°C' de inkübatörde geliştirilmiştir. Hücreler stoktan ilk çıkarıldıklarında 25 cm² 'lik steril flasklarda çoğaltılmış ve yeterli yoğunluğa ulaştığında hücreler pasajlanarak 75 cm² 'lik flasklara aktarılmıştır. Bu işlem yapılırken flastaki besiyeri uzaklaştırılmış ve 5 mL PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkamadan sonra PBS uzaklaştırılmış ve 500 µl TE (Trypsin-EDTA) eklenerek CO₂ li etüvde 3-5 dakika hücrelerin yüzeyden kalkması için bekletilmiştir. Mikroskopta hücreler kontrol edilmiştir. Kalkmayan hücrelerin yüzeyden kaldırılması için hafif mekanik güç uygulanmıştır. Flaska 5 mL besiyeri eklenerek tripsinin etkisinin nötralizasyonu sağlanan hücreler 50 mL'lik steril falkona alınmıştır.5 dakika 1200 rpm de santrifüj edildikten sonra dikkatlice dökülerek

süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine 15 mL taze besiyeri eklenerek resüspanse edilmiş ve hücreler 75 cm² 'lik flaska aktarılmıştır. Aynı pasaja ait hücreler daha sonraki deneylerde kullanılmak amacıyla; FBS ile stok yapılarak – 80°C'de saklanmıştır.

3.2.5.3. Hücre sayımı

75 cm² 'lik flaskta çoğalmış halde bulunan Caco-2 hücrelerinin sayımı için; öncelikle besiyeri uzaklaştırılmış, sonrasında 5 mL PBS ile yıkama yapılmış ve sonra 500 µL TE eklenerek CO₂ li etüvde 3-5 dakika bekletilerek hücrelerin kalkması sağlanmıştır. 5 mL besiyeri eklendikten sonra 50'lik steril falkona alınarak 1200 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 1 mL besiyeri eklenerek pipetaj yapılmıştır. Sayım için 10 µl Tripan Mavisi boyası ile 10 µl hücreden alınarak resüspanse edilerek Cedex Smart Slide (Roche–Almanya) kuyucuğuna 10 µl olacak şekilde aktarılarak Cedex (Roch –Almanya) hücre sayım cihazında sayılmıştır.

3.2.5.4. Sitotoksik aktivitenin MTT yöntemi ile belirlenmesi

MTT testi esas olarak ortamdaki aktif mitokondrilerle ilişkisi sebebiyle canlı hücre varlığıyla ilgili olan kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir. Canlılığa bağlı bu yöntem hücre proliferasyonu ve sitotoksisiteyi belirlemekte kullanılmaktadır. Bu yöntem aktif mitokondriler tarafından tetrazolyum tuzlarının indirgenmesi ve bu sayede formazan tuzlarına dönüşerek renk değiştirmesi esasına dayanmaktadır. Tetrazolyum tuzları, renksizken aktif mitokondrilerin tetrazolyum halkasını kırması sonucu renkli ürünler meydana getiren maddelerdir (Brunner and Holst-Hansen 1998; Mossman, 1983).

MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazoliumbromide] bu amaçla kullanılan ve substrat halde sarı renkte olan, pozitif yüklü ve hücre membranından geçebilen bir bileşiktir. Aktif mitokondrilerde süksinat-dehidrojenaz enzimine spesifik olarak bağlandığında suda çözünmeyen mavi-mor formazan tuzlarını oluşturur. Formazan tuzları organik çözücülerde (DMSO gibi) kolaylıkla çözünürler (Mossman, 1983).

Reaksiyon sonrasında çözücü ilavesi sonrasında formazan kristallerinin yoğunluğuna göre oluşan renk skalasına bağlı ölçüm yapılmaktadır. Bu renk skalası

canlı hücre yoğunluğunu göstermektedir. Ölü hücrelerin varlığında formazan tuzu oluşmaz, mavi-mor renk değişimi gözlenmez.

Yöntemin uygulanmasında; hücreler 96 kuyucuklu, steril tek kullanımlık düz tabanlı mikropalakalara 100 µl taze DMEM besiyeri içerisinde kuyu başına 1×10^4 hücre içerecek şekilde ekilmiştir. Hücreler gece boyunca %95 bağıl nem, %5 CO₂ ve 37°C’deki inkübatörde bekletilerek tabana yapışmaları sağlanmıştır. Ters çevrilerek besiyeri uzaklaştırılan hücrelere 100 µl besiyeri içerisinde 20, 15, 10, 5 mg/mL konsantrasyonlarda postbiyotik içeren örneklerin uygulaması yapılmıştır. Her madde için kontrol olarak sadece DMEM besiyeri eklenen kuyucuklar oluşturulurken, pozitif kontrol olarak doksorubisin 50,15, 10 ve 5 µM/mL ve negatif kontrol olarak ise; MRS besiyeri uygulanarak 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Maddelerin ve besiyerinin renk verme durumuna karşı örneklerin tüm konsantrasyonlarının ve besiyerinin olduğu kör plakası oluşturulmuş 24 saat inkübe edilmiş ve diğer tüm protokoller bu plakayada uygulanmıştır.

MTT uygulamasında 5 mg/mL olarak hazırlanmış MTT solüsyonundan her kuyuya 10 µl ilave edilerek formazan tuzlarının oluşması için 4 saat daha inkübasyona devam edilmiştir. 4 saat sonunda kuyucuklar ters çevrilerek boşaltılmış ve formazan tuzlarının çözünebilmesi için 100 µl DMSO ilave edilmiştir. 10-15 dakika karanlıkta bekletildikten sonra 540 nm dalga boyunda ELİSA cihazı ile oluşan renklerin optik yoğunlukları (absorbansları) okunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri, kültürdeki hücrelerin metabolik aktivitelerine karşılık gelen canlı hücre sayısı ile ilişkili olduğu için sonuçlar yüzde canlılık cinsinden ifade edilmiştir. Hesaplamalar yapılmadan önce; kör plakasının değerleri örnek plakasındaki değerlerden çıkarılmıştır.

$$\%Canlılık = \frac{\text{Örneğin absorbans değeri}}{\text{Kontrolün absorbans değeri}} \times 100 \quad (3.5)$$

3.2.5.5. Akış sitometride Annexin V-PI yöntemi ile apoptotik etkinin belirlenmesi

Akış sitometrisi 1934 yılında Andrew Moldoven’ın “akım boyunca kan hücrelerinin sayımı” tekniğini geliştirmesi ile başlayan ve günümüze hücrelerin tek tek karakterize edilmesini sağlamaya kadar gelmiş bir analiz sistemidir. Yöntemin prensibi, bir sıvı içerisinde hücrelerin enjeksiyon kanalı aracılığıyla alınarak akış kanalı içerisinde tek tek geçerken üzerlerine gönderilen lazer kaynağından aldıkları ışıkları

yaydıkları veya yaymadıkları sinyalleri farklı dedektörler ile toplayarak veri şekline dönüştürmesi ve bu veriler sonucunda hücre büyüklüğü ve granülaritesine göre sınıflandırılmasına dayanmaktadır (Shapiro, 2003).

Annexin V- PI yönteminde apoptotik etkinin belirlenmesi ise şöyle sağlanmaktadır. Apoptoz gelişmiş organizmalarda bulunan kontrollü hücre ölüm mekanizmasıdır. Apoptoz mekanizmasının işleyişi sırasında, normal hücrelerin hücre zarı yüzeyindeki membran lipitlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) in iç yüzeydeki konumundan hücre zarı dış yüzeyine trasloke olması işlemi gerçekleşir. Bu yer değiştirme erken apoptozda gerçekleşir ve bu durumda henüz hücre bütünlüğü bozulmamıştır. Bu bilgi ışığında hücrenin dış yüzeyinde bulunan fosfatidilserine bağlanabilen Annexin V proteini floresan bir madde ile işaretlenerek apoptotik hücrenin görünür hale gelmesi sağlanmıştır. Propidium iyodid (PI) direkt olarak DNA veya çift sarmallı RNA moleküllerine bağlanabilir, ölü ve hasar görmüş hücrelerin hücre membran yapısının bozulmuş olması nedeniyle bu bağlanma gerçekleşir. Sağlıklı hücrelerde bu bağlanma gerçekleşemez. Bu özellik sayesinde PI geç apoptoz ve ölüm evresindeki hücrelerin görünmesini sağlamaktadır (Gatti vd., 1998; Kopman vd., 1994; van England vd., 1998).

Çalışmamızda Annexin V Apoptosis Detection Kit protokolü uygulanmıştır. Uygun yoğunluğa gelen hücreler flasktan kaldırılmış sayımı yapılmış ve 6' lı plakalara 1 mL içerisinde 1×10^5 hücre içerecek şekilde ekimler yapılmıştır. 24 saat inkübasyonun ardından örnekler uygulanmıştır. Postbiyotiklerin MTT testinden elde edilen IC_{50} değerleri hücreler üzerine uygulanmış ve 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler plakalardan kaldırılarak 15 mL 'lik falkon tüplere alınmıştır. 1200 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellete 2 kez, 2 mL soğuk PBS eklenerek yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama sonrası pellet 100 µl PBS eklenerek resüspanse edilmiştir. Ependorflara 5'er µl olacak şekilde Annexin V ve PI boya konmuştur. Üzerine PBS ile resüspanse edilen hücreler eklenerek 20-25 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda ependorflara 1X Annexin V bağlanma tamponu eklenmiş ve akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) okumaları ve analizleri yapılmıştır.

3.2.6. 16S rRNA dizi analizi ile genotipik karakterizasyonların belirlenmesi

Seçilen izolatin tanımlanması amacıyla 16s rRNA dizi analizi yapılmıştır. Bu amaçla sıvı besiyerinde hazırlanan gecelik kültür kullanılmıştır. İzolatin DNA izolasyonu için EurX GeneMATRIX Bacterial & Yeast DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. Elde edilen DNA'nın saflık ve miktar analizleri için Thermo Scientific Nanodrop 2000 spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. 8 F ve 1387 R primeleri (Universal primerler) ile tür tayini için hedeflenen gen bölgeleri PCR kullanılarak çoğaltılmıştır. Bakteri izolasyon protokolü aşağıdaki gibidir.

Bakteri DNA izolasyon Protokolü

1- 1,5 mL ependorf tüpte karıştırılır.

A- 100 µl 1 gece inkübe edilmiş bakteriyal kültür 200 µl Lyse BG buffer

B-Petriden bakteriyal koloni alınarak 300 µl LYSE BG içerisinde süspansedilir.

C- 0.1-1.5 mL 1 gece inkübe edilen bakteriyal kültür santrifüj edilir ve oluşan pellet 300 µl Lyse BG bufferda süspansedilir.

2- 50 µl BL ve 2 µl RNase A eklenir ve 3 dakika karıştırılır (pipetleme veya vortex ile)

3- 37 °C'de 15 dakika inkübe edilir

4- 15 µl Proteinaz K ilave edilir. Birkaç defa karıştırılır ya da voretex ile 3 dakikakarıştırılır.

5- 55 °C'de 30 dakika inkübe edilir.

6- 350 µl Sol BG ilave edilir. Birkaç defa karıştırılır ya da voretex ile 3 dakika karıştırılır.

7- 55 °C'de 30 dakika inkübe edilir.

8- Lizat 2 dakika 11.000xg'de santrifüj edilir ve supernatant kısımdan 600 µl DNA binding spin kolona aktarılır ve collection tüpün üstüne konulur.

9- 1 dakika 11.000xg'de santrifüj edilir. Collection tüp boşaltılır ve spin-kolon tekrar collection tüpüne konulur.

10- Kalan lizat spin-kolona ilave edilir ve 1 dakika 11.000xg'de santrifüj edilir.

Collection tüp atılır ve spin kolon yeni bir collection tüpün üstüne konulur.

11- 450 µl Wash BGX buffer eklenir ve 11.000xg'de 1 dakika santrifüj edilir.

12- collection tüpteki sıvı boşaltılır ve spin-kolon tekrar collection tüpün üstüne konur.

13- 450 µl Wash BGX buffer eklenir ve 11.000xg'de 1 dakika santrifüj edilir.

- 14- Collection tüpteki sıvı boşaltılır ve spin-kolon tekrar collection tüpün üstüne konur.
- 15- Wash BGX bufferı tamamen uzaklaştırmak için tekrar 11.000xg'de 1 dakika santrifüj edilir.
- 16- spin- kolon yeni temiz bir tüpe alınır (1,5-2 mL) ve 50-100 µl elüsyon buffer eklenir.
- 17- 2dk oda sıcaklığında inkübe edilir.
- 18- 1 dakika 11.000xg'de santrifüj edilir.
- 19- Spin-kolon atılır ve tüp daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere 2-8 °C'de ve/veya -20 °C'de saklanır.

Elde edilen genomik DNA, kalıp DNA olarak kullanılarak 16S rRNA gen bölgesi için PCR kurulmuştur. Bu amaçla 8F= AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ve 1387R = GGGCGG WGTGTACAAGGC evrensel primerleri kullanılmıştır. Reaksiyon bileşenleri olarak, 10X TaqBuffer (+KCl-MgCl₂), 2,5 µ L; 25 mM MgCl₂, 2,5 µ L; 2,5 mM dNTP mix, 2,5 µ L; 2,5 mM 27F primer, 2,5 µ L; 2,5 mM 1492R primer 2,5 µ L; Taq polimeraz (5 u/ µ L), 0,25 µ L; nükleaz içermeyen distile su, 11,75 µ L; kalıp DNA, 1 µL kullanılmıştır. PCR işleminde, ön denatürasyon basamağı 94°C'de 3 dak.; denatürasyon basamağı 94°C'de 30 sn., bağlanma basamağı 55°C'de 1 dak., uzama basamağı 72°C'de 2 dak., 35 döngü; son uzama basamağı ise 72°C'de 5 dak. Olarak yapılmıştır.

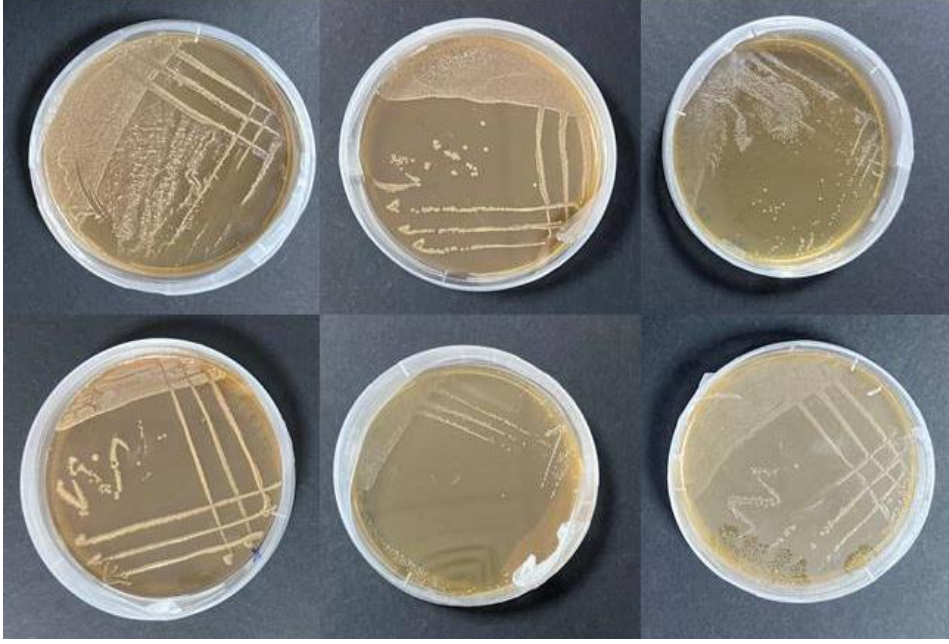
Sanger dizileme ile elde edilen okumalar, bir konsensüs dizi oluşturmak amacıyla kontig haline getirilmiştir. Bu işlemin gerçekleştirilmesinde BioEdit yazılımı içinde CAP contig assembly algoritması kullanılmıştır. Diziler NCBI (National Center for Biotechnology Information) üzerinden eşleştirilerek en yakın tür belirlenmiştir. İzolatların dizi analizleri, Microbiota Biyoteknoloji Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketine hizmet alımı yoluyla yaptırılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Kolostrumdan Mikroorganizma İzolasyonu

Tez kapsamında Afyonkarahisar ili, Sandıklı ilçesi, Reşadiye köyünden besi ve mera hayvancılığı yapan yetiştiricilerden temin edilen 2 farklı yaş ve farklı doğum sayısına sahip sığırlardan alınan kolostrum örnekleri kullanılmıştır. Kolostrum örneklerinden morfolojik yapıları farklı gözükten 52 izolat izole edilmiştir. İzolatlar isimlendirilirken; 1 ile başlayan kodlamadaki izolatlar 5 yaşında ve 3.doğumu olan sığır kolostrumundan, 2 ile başlayanlar ise 4 yaşında ve 2.doğumu olan sığır kolostrumundan izole edilmelerine göre yapılmıştır. Numaralandırmada ilk rakam kolostrumun alındığı sığırı, ikinci rakam kaçınıcı dilüsyondan alındığını, sondaki rakam ise izole edildiği petrideki kaçınıcı izolat olduğunu gösteren rakamdır. Parantez içindeki F izolatin fermente kolostrumdan alındığını göstermektedir.

Yapılan izolasyon sonucunda 5 yaşında ve 3.doğumu olan sığır kolostrumundan koloni morfolojilerine bakılarak 24 mikroorganizma izole edilmiştir. Bunlardan 20 tanesi direkt -20°C' den alınan kolostrumdan, 4 tanesi fermente edilmiş kolostrumdan izole edilmiştir. 4 yaşında ve 2.doğumu olan sığır kolostrumundan koloni morfolojilerine bakılarak 28 mikroorganizma izole edilmiştir. Bunlardan 19 tanesi direkt -20°C' den alınan kolostrumdan, 9 tanesi fermente edilmiş kolostrumdan izole edilmiştir.



Görsel 4.1. Kolostrumdan izole edilen mikroorganizma örnekleri

Çizelge 4.1. -20°C izole edilen izolatların kod numaraları

5 yaşında ve 3.doğumu olan sığır kolostrumundan izole edilen izolatlar	4 yaşında ve 2.doğumu olan sığır kolostrumundan izole edilen izolatlar
1. 2. 1- İzolat 1	2. 1. 1- İzolat 21
1. 2. 2- İzolat 2	2. 1. 2- İzolat 22
1. 2. 3- İzolat 3	2. 1. 3- İzolat 23
1. 3. 1- İzolat 4	2. 2. 1- İzolat 24
1. 3. 2- İzolat 5	2. 2. 2- İzolat 25
1. 4. 1- İzolat 6	2. 2. 3- İzolat 26
1. 4. 2- İzolat 7	2. 2. 4- İzolat 27
1. 4. 3- İzolat 8	2. 3. 1- İzolat 28
1. 4. 4- İzolat 9	2. 3. 2- İzolat 29
1. 4. 5- İzolat 10	2. 3. 3- İzolat 30
1. 4. 6- İzolat 11	2. 3. 4- İzolat 31
1. 4. 7- İzolat 12	2. 3. 5- İzolat 32
1. A. 1-İzolat 13	2. A. 1-İzolat 33
1. A. 2-İzolat 14	2. A. 2-İzolat 34
1. A. 3-İzolat 15	2. 4. 1- İzolat 35
1. A. 4-İzolat 16	2. 4. 2- İzolat 36
1. A. 5-İzolat 17	2. 4. 3- İzolat 37
1. A. 6-İzolat 18	2. 4. 4- İzolat 38
1. A. 7-İzolat 19	2. 4. 5- İzolat 39
1. A. 8-İzolat 20	

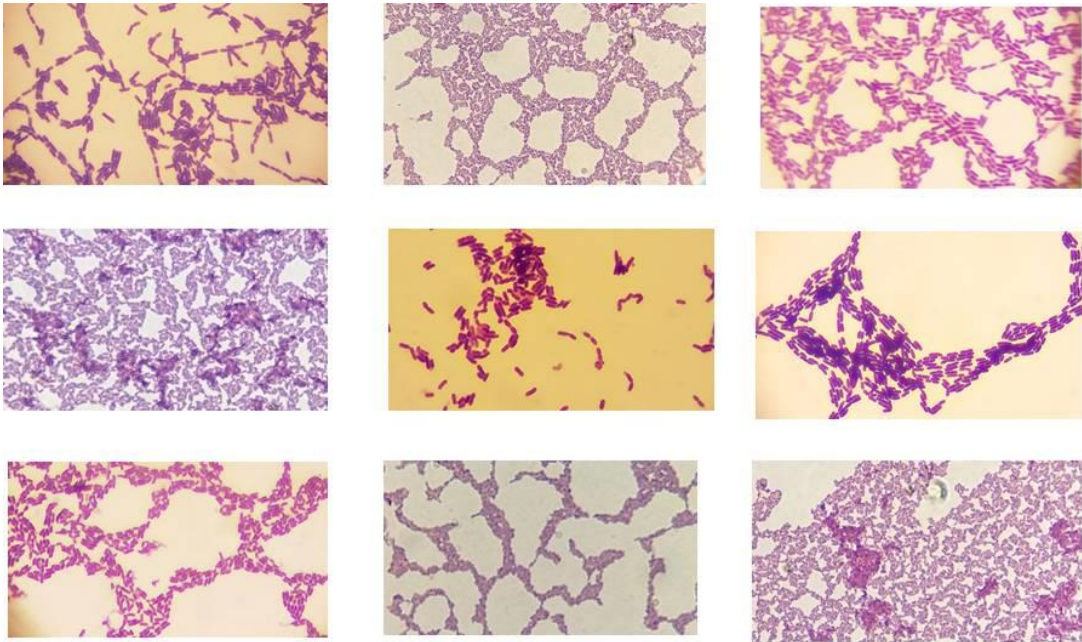
Çizelge 4.2. 21 gün inkübatörde fermente edilmiş sığır kolostrumundan izole edilen izolatların kod numaraları

5 yaşında ve 3.doğumu olan sığır kolostrumundan izole edilen izolatlar	4 yaşında ve 2.doğumu olan sığır kolostrumundan izole edilen izolatlar
1. 3. 1 (F)- İzolat 40	2. A. 1 (F)- İzolat 44
1. 4. 1 (F)- İzolat 41	2. A. 2 (F)- İzolat 45
1. 4. 2 (F)- İzolat 42	2. A. 3 (F)- İzolat 46
1. 4. 3 (F)- İzolat 43	2. A. 4 (F)- İzolat 47
	2. 4. 1 (F)- İzolat 48
	2. 4. 2 (F)- İzolat 49
	2. 4. 3 (F)- İzolat 50
	2. 4. 4 (F)- İzolat 51
	2. 4. 5 (F)- İzolat 52

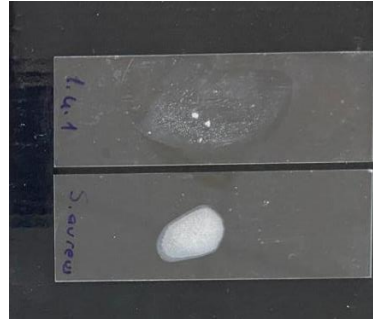
4.2. İzolatların Tanımlanması

4.2.1 Gram boyama ve katalaz testi sonuçları

Elde edilen bu izolatlara yapılan gram boyama ve katalaz testi sonucunda 52 izolattan 11 izolatın gram pozitif (+) ve katalaz negatif (-) basil olduğu,17 izolatın gram pozitif (+) ve katalaz negatif (-) kok olduğu, 2 izolatın gram pozitif (+) ve katalaz pozitif (+) basil olduğu, 6 izolatın gram pozitif (+) ve katalaz pozitif (+) kokobasil olduğu ve 16 izolatın gram pozitif (+) ve katalaz pozitif (+) kok olduğu belirlenmiştir.



4.2. Saf kültür izolatlarının gram boyama örnekleri



Görsel 4.3. Katalaz negatif (-) ve pozitif (+) sonuç örneği

Çizelge 4.3. Kolostrumdan izole edilen mikroorganizma izolatları

Kod numarası	Gram özelliği	Hücre şekli	Katalaz
1.3.1(F), 1.4.1(F), 1.4.2(F), 1.4.3(F), 2.A.1(F), 2.A.3(F), 2.A.4(F), 2.4.1(F), 2.4.2(F), 2.4.3 (F), 2.4.5(F)	(+)	Basil	(-)
1.2.2, 1.2.3, 1.3.1, 1.4.3, 1.4.5, 1.A.1, 1.A.2, 1.A.3, 1.A.7, 2.1.2, 2.1.3, 2.2.3, 2.2.4, 2.3.1, 2.3.4, 2.3.5, 2.4.3	(+)	Kok	(-)
2.A.2(F), 2.4.4	(+)	Basil	(+)
1.4.4, 1.A.4, 1.A.5, 1.A.8, 2.3.2, 2.4.4(F)	(+)	Kokobasil	(+)
1.2.1, 1.3.2, 1.4.1, 1.4.2, 1.4.6, 1.4.7, 2.1.1, 2.2.1, 2.2.2, 2.3.3, 2.A.1, 2.A.2, 1.A.6, 2.4.1, 2.4.2, 2.4.5	(+)	Kok	(+)

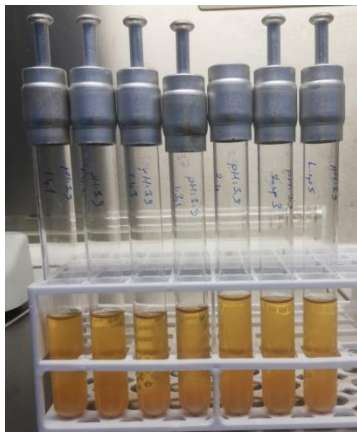
Bundan sonraki çalışmalara; Gram boyama ve katalaz testi uygulanan mikroorganizmalardan, spor oluşturmeyen, gram pozitif (+) ve katalaz negatif (-) basil izolatları üzerinden devam edilmiştir. Bu izolatlar; 1.3.1 (F), 1.4.1 (F), 1.4.2 (F), 1.4.3 (F), 2.A.1 (F), 2.A.3 (F), 2. A.4 (F), 2.4.1 (F), 2.4.2 (F), 2.4.3 (F), 2.4.5 (F) izolatları olup diğer biyokimyasal çalışmaları bu izolatlar üzerinden devam etmiştir. *Staphylococcus aureus* katalaz testi için pozitif kontrol mikroorganizması olarak kullanılmıştır (Çizelge 4.3; Şekil 4.3).

4.2.2. İzole edilen mikroorganizmaların biyokimyasal aktivite sonuçları

11 tane Gram (+) ve katalaz (-) basil morfolojisine sahip bakteri izolatları için, iki farklı pH; pH 3.9 ve pH 9.6; üç farklı tuz konsantrasyonu %6, %7.5 ve %10 NaCl; hareketlilik, TSI agarda gelişme ve H₂S oluşumu testleri uygulanmıştır. Çizelge 4.4'te 11 tane katalaz (-) Gram (+) basil bakteri izolatlarının farklı pH' da gelişim, farklı tuz konsantrasyonlarında gelişim, TSI da üreme, hareketlilik ve hidrojen sülfür oluşumu oluşumu test sonuçları verilmiştir (Çizelge 4.4, 4.5, 4.6).



Görsel 4.4. TSI agarda üreme, hareketlilik ve H₂S oluşumu

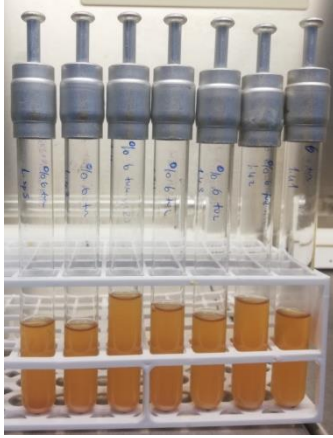


(a)



(b)

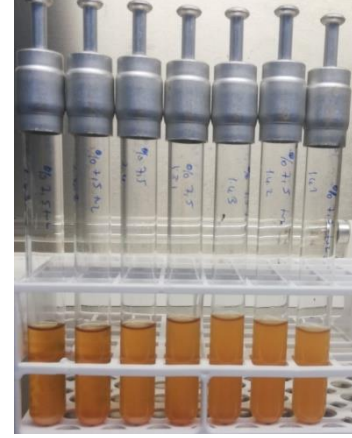
Görsel 4.5. pH 3.9 ve 9.6 da üreme görüntüleri (a: pH 3.9; b: pH 9.6)



(a)



(b)



(c)

Görsel 4.6. %6, %7.5, %10 NaCl içeren ortamda üreme (a: %6 NaCl, b: %10 NaCl, c: %7.5 NaCl)

Çizelge 4.4. Gram (+), Katalaz (-), basil bakterileri izolatlarının biyokimyasal aktivite testleri. (+): pozitif, (-): negatif, (±): belirsiz

Kod numarası	pH 3.9 da gelişim	pH 9.6' da gelişim	%6 NaCl 'de gelişim	%7.5 NaCl 'de gelişim	%10 NaCl 'de gelişim	Hareketlilik	TSI'da üreme	H ₂ S oluşumu
1.3.1 (F)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
1.4.1 (F)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
1.4.2 (F)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
1.4.3 (F)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
2.A.1(F)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
2.A.3(F)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
2.A.4(F)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
2.4.1 (F)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
2.4.2 (F)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
2.4.3 (F)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
2.4.5 (F)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)

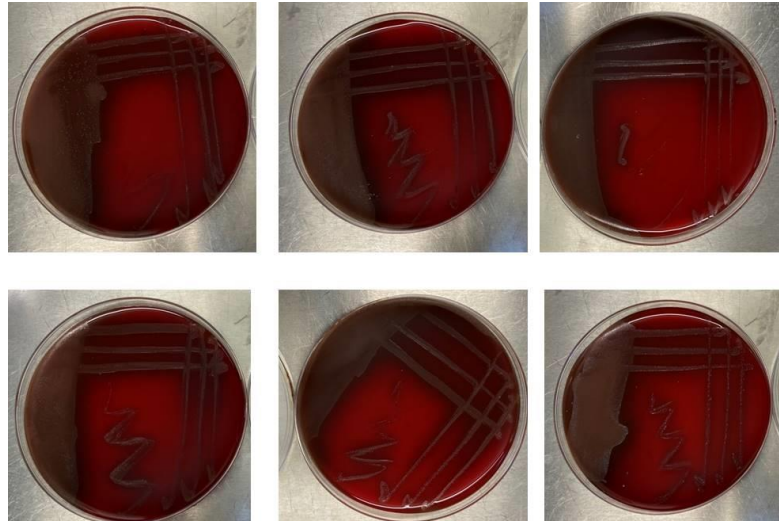
Bu sonuçlara göre; 11 izolatın 2 tanesinin hareketli, 9 izolatın TSI besiyerinde ürettiği gözlenmiş olup 11 izolattan hiçbirinde H₂S ve gaz oluşumu gözlenmemiştir. Farklı pH' lardaki gelişimlerine göre; pH 3.9'da izolatlardan 9 tanesi gelişim gösterirken, 2 izolat gelişim göstermemiştir. Ayrıca, pH 9.6'da tüm izolatlar gelişim göstermiştir. Farklı tuz konsantrasyonlarındaki gelişimleri ise; %6 ve %7.5 NaCl içeren ortamda tüm izolatlar gelişme göstermiş olup, %10 NaCl içeren ortamda ise; 9 izolat üremiş, 2 izolat ürememiştir (Çizelge 4.4).

LAB' ların gram pozitif, katalaz negatif, hareketsiz, spor oluşturmeyen, aside dayanıklı, basil, kok ve koko-basil morfolojisine sahip olmak gibi genel özelliklerinden yola çıkılarak bu izolatlardan LAB olduğu düşünülen basil morfolojisine sahip 7 izolat ile çalışmalara devam edilmiştir (Hofvendahl vd., 2000; O'Sullivan et vd., 2002).

Çalışmalarda kullanılacak olan gram pozitif, katalaz negatif, hareketsiz, aside dayanıklı basil izolatları 1.3.1 (F), 1.4.1 (F), 1.4.2 (F), 1.4.3 (F), 2. A.4 (F), 2.4.3 (F), 2.4.5 (F) olarak belirlenmiştir.

4.2.3. İzole edilen mikroorganizmaların hemolitik aktivite sonuçları

Hemolitik aktiviteyi belirlemek için, 37 °C'de geliştirilen gecelik kültürlerden kanlı agar ortamına tek koloni ekimi yöntemiyle bakteri izolatlarının ekimleri yapılmıştır. 37 °C'de 24 saat inkübasyondan sonra, kolonilerin etrafında zon oluşumu gözlenmiştir. Kanlı agar petrilerinde zon oluşumuna göre hemolitik aktivite belirlenmiştir. Hemolitik aktivite, parlak-yeşil zon oluşturan koloniler α -hemolitik, berrak zon oluşturanlar β hemolitik, zon oluşturmeyenler ise γ -hemolitik olarak belirlenmiştir (Maragkoudakis vd., 2006). Hemolitik aktivite çalışılan tüm izolatlarda zon oluşumu gözlenmemiş olup γ -hemolitik olarak değerlendirilmiştir (Görsel 4.7).



Görsel 4.7. Hemolitik aktivite γ -hemolitik izolatların petri görüntüsü

Literatüre göre; robiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmaların γ -hemolitik suşlar olması, dolayısıyla hemolize neden olmamaları gerekmektedir (Maragkoudakis vd., 2006, Mourad ve Nour-Eddine 2006).

4.2.4. Biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi

LAB' lar bağırsak yüzeyine tutunabilme yetenekleri açısından diğer birçok mikroorganizma ile rekabet ederek sindirim sisteminde canlılığını koruyabilmekte ve kolonize olabilmektedir (Gülgör ve Özçelik, 2014; Arena 2017)

Çalışmada kullanılan izolatlar ve pozitif kontrol olarak kullanılan *E. coli* 35298 ve *E. faecalis* 51299 suşlarının biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi için mikropilaka yöntemi kullanılmıştır. Mikroorganizmalar ve pozitif kontrol olarak kullanılan mikroorganizmalar 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna Mc Farland 0.5 'e göre ayarlanmış kültürden 200'er μ l olarak dağıtılmıştır. Plakalar, 48 saat 37 °C'de etüvde inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda mikropilakalar, PBS ile yıkanmış ve kurutulmuştur. Metanol ile fikse edilmiş ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Üzerine %0.1' lik kristal viyole çözeltilisinden 150 μ l eklenerek 15 dakika boyunca biyofilm tabakasının boyanması sağlanmıştır. Plakalar musluk suyu ile yıkanmış ve kurutulmuştur. Spektrofotometrede ölçüm yapılmadan 30 dakika önce kuyucuklara %95' lik etanol eklenmiştir. Kristal viyole ile boyanan bakteriler ELİSA'da 570 nm' de okunan dansite değerlerine göre biyofilm oluşumu zayıf, orta güçlü ve negatif olarak değerlendirilmiştir.

Değerlendirme 570 nm' deki optik dansite (OD) değerlerinin ortalaması alınarak hesaplanır. OD_k değeri steril besiyeri ortalaması ve standart sapma değeridir. Eğer OD değeri $OD \leq OD_k$ ise biyofilm oluşumu negatif; OD değeri $OD_k \leq OD \leq 2 \times OD_k$ ise biyofilm oluşumu zayıf; $2 \times OD_k \leq OD \leq 4 \times OD_k$ ise biyofilm oluşumu orta; $4 \times OD_k \leq OD$ ise biyofilm oluşumu güçlü olarak değerlendirilmiştir. (Stepanovic vd., 2007). Çalışmamızda sadece besiyeri bulunan kuyucukların olduğu $OD_k = 0,138$ optik dansite değeri olarak okunmuştur. Deneyle biribirinden bağımsız 8 tekrarlı olarak çalışılmıştır.

Çizelge 4.5. 7 izolat ve *E. coli* 35298 ve *E. faecalis* 51299 suşlarının biyofilm oluşturma yetenekleri ($OD_{600} = 0,138$)

Kod numarası	Optik dansite değeri aralığı	Optik dansite ortalaması	Biyofilm oluşumu
1.3.1 (F)	0,166-0,367	0,264	Zayıf
1.4.1 (F)	0,348-0,534	0,443	Orta
1.4.2 (F)	0,370-0,723	0,558	Güçlü
1.4.3 (F)	0,337-0,545	0,444	Orta
2.A.4(F)	0,216-0,278	0,242	Zayıf
2.4.3 (F)	0,202-0,312	0,258	Zayıf
2.4.5 (F)	0,364-0,651	0,514	Orta
<i>E.coli</i> 35298	0,376-0,574	0,481	Orta
<i>E.faecalis</i> 51299	0,312-0,504	0,408	Orta

Biyofilm oluşumu gözlenen LAB' lar içerisinde ise daha çok “zayıf biyofilm üreten” suşların olduğu sonucuna varılmıştır. (Çizelge 4.5)

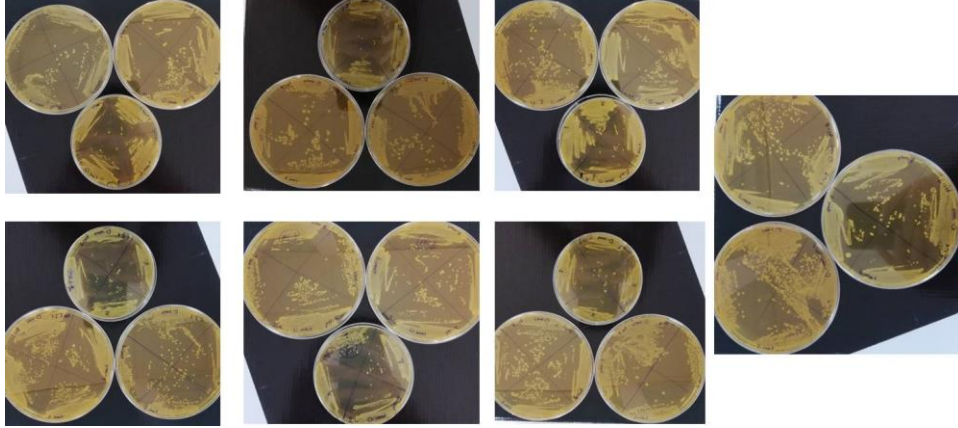
Yapılan çalışmalarda tanımlanan LAB'ların biyofilm oluşturma kapasitelerine bakıldığında, biyofilm oluşumu için gereken koşulların farklılar içerdiğini ve her mikroorganizma suşu için değişken olduğu görülmüştür (Akan ve Kınık, 2014; Gün ve Ekinci, 2009).

4.3. LAB İzolatlarının Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi

LAB olduğu düşünülen 7 izolatın probiyotik özellikleri belirlenmek için aşağıdaki deneyler yapılmıştır.

4.3.1. Asit direncinin belirlenmesi

Probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmaların en önemli özelliklerinden birisi farklı koşullara karşı direnç gösterebilmeleridir. Bu farklı koşullar; düşük pH'da gelişebilme yani mide asitliğine dayanıklı olma ve safra tuzlarına karşı dirençli olmaktır (Alp ve Kuleşan, 2019; Ertekin, 2007).

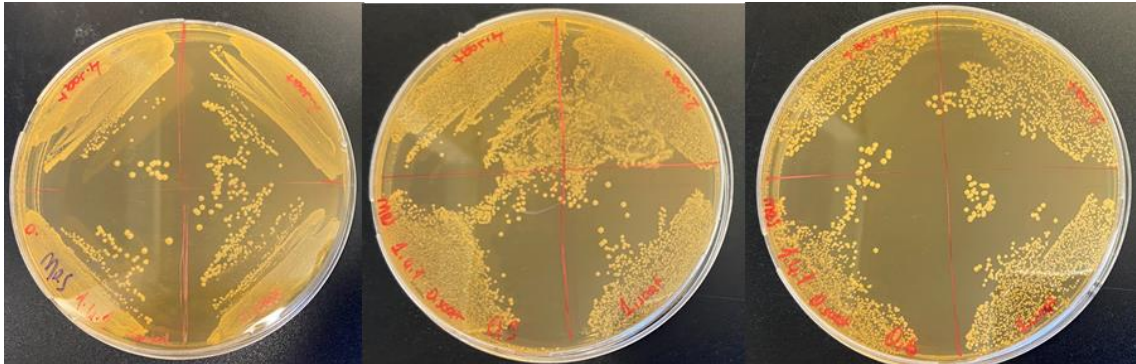


Görsel 4.8. pH:2, pH:3 MRS broth asit ortamında ve kontrol ortamı olan pH: 7 MRS broth ortamında 4 saat inkübe edilen LAB izolatlarının 0., 1., 2., 4. saatlerde MRS agarda gelişimleri)

Mide asitliğinde canlı kalma becerileri inkübasyon sonunda petrilere oluşan kolonilerin varlığı not edilerek belirlenmiştir. pH 2 ve pH 3 asit ortamına 4 saat süreyle maruz bırakılan 1.3.1 (F), 1.4.1 (F), 1.4.2 (F), 1.4.3 (F), 2. A.4 (F), 2.4.3 (F), 2.4.5 kod numaralı LAB izolatlarının 0., 1., 2. ve 4. saatin sonunda üremeleri görsel 4.8’ de gösterilmiştir. 4. saatin sonunda tüm izolatlarda belirgin bir üreme gözlenmiştir. LAB’ların asite dayanıklı olduğunu bilinmektedir (Kazancıgil, 2018).

4.3.2. Safra tuzu direncinin belirlenmesi

Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların gastrointestinal sisteme (GIS)’ e geçişleri ve sistemde kalabilmeleri için düşük pH’ da gelişebilmeleri ve safra tuzlarına karşı dayanıklı olmaları gerekmektedir. (Başyigit vd., 2007).



Görsel 4.9. %0.3 ve %0.6 safra tuzu içeren MRS broth ortamında ve kontrol ortamı normal MRS broth ortamında 4 saat inkübe edilen LAB izolatlarının 0., 1., 2., 4. saatlerde MRS agarda gelişimleri)

Safra tuzunda canlı kalma becerileri inkübasyon sonunda petrilere oluşan kolonilerin varlığı not edilerek belirlenmiştir. %0.3 ve %0,6 safra tuzu içeren ortama 4 saat süreyle maruz bırakılan 1.3.1 (F), 1.4.1 (F), 1.4.2 (F), 1.4.3 (F), 2. A.4 (F), 2.4.3 (F), 2.4.5 kod numaralı LAB izolatlarının 0., 1., 2. ve 4. saatin sonunda üremeleri görsel 4.9’ da gösterilmiştir. 4. saatin sonunda tüm izolatlarda belirgin bir üreme gözlenmiştir. Safra içeren MRS broth ortamında inkübasyona bırakılan LAB’ ların kontrol ortamındaki üremeleriyle kıyaslandığında aynı oranda üreme gösterdikleride belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda %0.3 safra tuzuna direncin probiyotik suşların seçiminde seçici bir özellik olduğu vurgulanmıştır (Klingberg vd., 2005).

4.3.3. Otoagregasyon özelliklerinin belirlenmesi

Otoagregasyon yeteneği, probiyotik özellikteki bakterilerin intestinal sistem hücrelerinin dış yüzeyine tutunabilmesi için önemli bir özelliktir. Otoagregasyon özelliği, patojen mikroorganizmaların bağırsak yüzeyine yerleşmesinin engellenmesi için sindirim sistemindeki probiyotik özellikli mikroorganizmaların koloni oluşturarak bir araya gelmesini sağlamada önemlidir (Gallego vd., 2019; Tareb vd., 2013).

48 saatlik inkübasyon sonrasında falkonlara alınarak santrifüj edilen izolat kültürlerinin süpernatantı uzaklaştırıldıktan sonra kalan pellet 2 kez PBS ile yıkanmıştır. PBS içerisinde çözülen pellet optik dansite (OD) 600 nm’ye ayarlanmış spektrofotometrede ölçüldükten sonra oda sıcaklığında 4 saat boyunca bekletilmiştir. 4 saat sonunda çözeltilinin üst kısmından 0.1 mL alınarak OD 600 nm’ye ayarlanmış spektrofotometrede okunmuş ve hesaplamalar yapılmıştır.

Hesaplamalara göre LAB izolatlarının ortalama otoagregasyon yetenekleri % 14.56 olarak bulunmuştur. Çizelge 4.6’ da gösterildiği gibi LAB izolatlarının 1.3.1 (F), 1.4.1 (F), 1.4.2 (F), 1.4.3 (F), 2. A.4 (F), 2.4.3 (F), 2.4.5 otoagregasyon yetenekleri sırasıyla, %9.7, %3.80, %46.22, %4.1, %10.3, %8.8, %19 olarak belirlenmiştir.

Çin’de yapılan bir çalışmada, fermente geleneksel ürünlerden izole edilmiş 18 LAB’ın otoagregasyon özelliği ile Caco-2 hücrelerine yapışma yetenekleri incelenmiş

ve otoagregasyon kabiliyetinin %5,92 ile %23,32 arasında olduğu belirtilmiştir (Li vd., 2015).

Çizelge 4.6. LAB izolatlarının otoagregasyon yeteneklerinin belirlenmesi

Kod numarası	% Otoagregasyon
1.3.1 (F)	9.7
1.4.1 (F)	3.80
1.4.2 (F)	46.22
1.4.3 (F)	4.1
2.A.4(F)	10.3
2.4.3 (F)	8.8
2.4.5 (F)	19

4.3.4. Koagregasyon özelliklerinin belirlenmesi

Koagregasyon yeteneğinin probiyotik özellik gösteren bakteriler için patojenlerin doku reseptörlerine girişini engellemekte ve patojen bakterilerin epitel hücrelere yapışmasına engel olmakta etkili bir alternatif olduğu bildirilmiştir (Balakrishna 2013; Reniero vd., 1991; Charteris vd., 1997).

48 saatlik inkübasyon sonrasında falkonlara alınarak santrifüj edilen izolatlara ait kültürlerin, süpernatantı uzaklaştırıldıktan sonra kalan pellet 2 kez PBS ile yıkanmıştır. PBS içerisinde çözülen pellet optik dansite (OD) 600 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede ölçülmüştür. LAB kültürü ve test bakterisinden eşit miktarda örnek alınarak aynı tüp içerisinde Vortex yardımı ile 10-15 saniye karıştırılmış ve daha sonra oda sıcaklığında 4 saat bekletilmiştir. 4 saat sonunda çözeltinin üst kısmından 0,1 mL alınarak OD 600 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede okunmuş ve hesaplamalar yapılmıştır.

S. aureus ve *E. coli* ile LAB arasında koagregasyon özelliklerinin belirlenmesisonucunda LAB izolatlarının ortalama koagregasyon yetenekleri *E. coli* ATCC 35298 ile %47, *S. aureus* ATCC 25923 ile %56,3 olarak bulunmuştur. Çizelge 4.7' de gösterildiği gibi LAB izolatlarının (1.3.1 (F), 1.4.1 (F), 1.4.2 (F), 1.4.3 (F), 2. A.4 (F), 2.4.3 (F), 2.4.5(F)) *E. coli* ile koagregasyon yetenekleri sırasıyla, %63.1, %46.2, %44.3, %43, %64.5, %34.4, %36.5 olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.8' de gösterildiği gibi LAB izolatlarının (1.3.1 (F), 1.4.1 (F), 1.4.2 (F), 1.4.3 (F), 2. A.4 (F), 2.4.3 (F), 2.4.5(F)) *S. aureus* ile koagregasyon yetenekleri sırasıyla, %49.9, %69, %61, %36.2, %40.2, %64.7, %73.7 olarak belirlenmiştir. İzolatlardan *E. coli* ATCC 35298

test bakteri üzerinde en düşük %34.4 olarak 2.4.3(F) izolatında görülürken, en yüksek koagregasyon değeri %64.5 olarak 2.A.4(F) izolatında bulunmuştur. İzolatlardan *S. aureus* ATCC 25923 test bakteri üzerinde en düşük %36.2 olarak 1.4.3 (F) izolatında görülürken, en yüksek koagregasyon değeri %73.7 olarak 2.4.5 (F) izolatında bulunmuştur.

Çizelge 4.7. LAB izolatlarının *E. coli* ATCC 35298 ile % koagregasyon değerleri

Kod numarası	% Koagregasyon
1.3.1 (F)	63.1
1.4.1 (F)	46.2
1.4.2 (F)	44.3
1.4.3 (F)	43
2.A.4(F)	64.5
2.4.3 (F)	34.4
2.4.5 (F)	36.5

Çizelge 4.8. LAB izolatlarının *S. aureus* ATCC 25923 ile % koagregasyon değerleri

Kod numarası	% Koagregasyon
1.3.1 (F)	49.9
1.4.1 (F)	69
1.4.2 (F)	61
1.4.3 (F)	36.2
2.A.4(F)	40.2
2.4.3 (F)	64.7
2.4.5 (F)	73.7

Yapılan çalışmalarda *Lactobacillus* türlerinin, patojen bakterilerle koagregasyon yeteneğine sahip olduğunu rapor edilmiştir (Balakrishna 2013; Charteris vd., 1997).

4.3.5. Antibiyotik duyarlılığı testi sonuçları

LAB'lar ve pozitif kontrol olarak kullanılan mikroorganizmalar 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna Mc Farland 0.5' e göre ayarlandıktan sonra 1/10 oranında dilüye edilen LAB'lar MRS broth ortamında, *E. coli* 35298 suşu ise MHB ortamında 100 µl olacak şekilde kuyucuklara ekim yapılmıştır. Ekimlerden sonra 14 farklı antibiyotikten 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 ve 64 µg olacak şekilde konsantrasyonlar hazırlanmış ve her bir bakteri için çift paralel olacak şekilde belirtilen

konsantrasyonlarda verilmiştir. Bir kuyucuğa pozitif kontrol için antibiyotik uygulaması yapılmamıştır. Plakalar 37°C 24 saat inkübasyon sonunda üremenin olmadığı ilk kuyucuk etkili konsantrasyon olarak belirlenmiştir. *E. coli* ATCC 35298' nin pozitif kontrol olarak kullanıldığı deneyde LAB izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları çizelge 4.9' da sunulmuştur.

Çalışmada aminopenisilin G, novobiosin, kloramfenikol, ampisilin, sefamezin, siproflaksasin, sefalotin C4520, nifuroksazid, streptomisin 56501, penisilin G, kanamisin sülfat 8324, eritromisin A2275, vankomisin, eritromisin E6376 olmak üzere 14 farklı antibiyotik kullanılmıştır. Çalışma sonucunda LAB izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları birbirine paralel olarak bulunmuştur. Kanamisin sülfat 8324 ve vankomisine tüm LAB suşlarının dirençli olduğu gözlenmiştir. Nifuroksazid, Aminopenisilin G ve Streptomisin 56501 antibiyotiklerine karşı yüksek oranda dirençli oldukları gözlenmiştir.



Görsel 4.10. Antibiyotik duyarlılıkları

LAB' ların antibiyotik duyarlılıklarının, tür ve suşlar arasında değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir (Gulshan ve Moye-Rowley, 2007).

Çizelge 4.9. LAB izolatları ve *E. coli* ATCC 35298' in antibiyotik duyarlılıkları (-: üremenin olmadığını, R: Antibiyotiğe dirençli olduğunu belirtmektedir)

Antibiyotikler	İzolat Kodları							
	1.3.1(F)	1.4.1(F)	1.4.2(F)	1.4.3(F)	2.A.4(F)	2.4.3(F)	2.4.5(F)	<i>E.coli</i>
Aminopenisilin G	64	64	64	64	64	64	64	R
Novobiosin	1	(-)	(-)	2	1	1	2	R
Kloramfenikol	4	4	4	4	4	4	4	32
Ampisilin	(-)	(-)	(-)	(-)	1	(-)	(-)	R
Sefamezin	16	16	16	16	16	16	16	8

Çizelge 4.9. (Devam) LAB izolatları ve *E. coli* ATCC 35298' in antibiyotik duyarlılıkları (-: üremenin olmadığını, R: Antibiyotiğe dirençli olduğunu belirtmektedir)

Siproflaksasin	4	4	4	4	4	4	4	4
Sefalotin C4520	8	8	16	16	16	16	8	32
Nifuroksazid	R	64	64	64	R	32	32	8
Streptomisin 56501	64	64	64	64	R	64	64	R
Penisliin G	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	0.5
Kanamisin sülfat 8324	R	R	R	R	R	R	R	0.5
Eritromisin A2275	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	32
Vankomisin	R	R	R	R	R	R	R	0.5
Eritromisin E6376	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	64

4.3.6. Laktik asit üretim miktarının belirlenmesi

48 saat LAB'lar inkübe edildikten sonra erlen içerisine 1 mL kültürden alınarak 99 mL steril distile su ilave edilmiş ve 100 mL' ye tamamlanmıştır. Fenol fitalein indikatöründen 2-3 damla damlatıldıktan sonra 0,1 M NaOH ile titrasyon yapılmıştır. Pembe renk oluşumunun gözlemlendiği ilk NaOH miktarı mL cinsinden alınarak hesaplamalar yapılmıştır.

Çizelge 4.10' da LAB izolatlarının laktik asit üretim miktarları verilmiştir. Buna göre laktik asit üretim miktarları 1.3.1 (F), 1.4.1 (F), 1.4.2 (F), 1.4.3 (F), 2.A.4(F), 2.4.3 (F) ve 2.4.5 (F) izolatlarında sırasıyla %2.43, %2.4, %2.34, %2.25, %2.43, %2.52, %2.16 olarak hesaplanmıştır.



Görsel 4.11. Laktik asit tayini deneyi titrasyon sonucu renk oluşumu

Çizelge 4.10. % Laktik asit üretimi

Kod numarası	%Laktik asit üretimi
1.3.1 (F)	2.43
1.4.1 (F)	2.4
1.4.2 (F)	2.34
1.4.3 (F)	2.25
2.A.4(F)	2.43
2.4.3 (F)	2.52
2.4.5 (F)	2.16

4.3.7. LAB izolatlarının antimikrobiyal aktivite sonuçları

Antimikrobiyal aktivite deneyi yapılırken direkt LAB kültürünün kendisi ile agar kuyucuk difüzyon yöntemi kullanılmış ve genel tarama çalışması yapılmıştır. Zon çapları göz önüne alınarak konsantrasyon ayarlaması yapılan hücresiz kültür süpernatantlarının liyofilize halleri ile Minimal İnhibisyon Konsantrasyonunu (MİK) değerini daha net değerlendirebilmek için Mikrobroth Dilüsyon metodu kullanılmıştır.

Postbiyotiklerin kullanıldığı devam eden çalışmalarda izolat kodlamaları Çizelge 4.11’ de gösterildiği şekilde olacaktır.

Çizelge 4.11. Kullanılacak postbiyotiklerin kod numaraları ve anlamları

1.3.1 (FLS)	1.3.1 Kodlu fermente izolat postbiyotiği
1.4.1 (FLS)	1.4.1 Kodlu fermente izolat postbiyotiği
1.4.2 (FLS)	1.4.2 Kodlu fermente izolat postbiyotiği
1.4.3 (FLS)	1.4.3 Kodlu fermente izolat postbiyotiği
2.A.4(FLS)	2.A.4 Kodlu fermente izolat postbiyotiği
2.4.3 (FLS)	2.4.3 Kodlu fermente izolat postbiyotiği
2.4.5 (FLS)	2.4.5 Kodlu fermente izolat postbiyotiği

4.3.7.1. Agar kuyucuk difüzyon metodu

LAB’ ların farklı antagonistik bileşikler ürettiği bilinmektedir. Biyo-koruyucu ajanlar olarak da adlandırılan LAB’ların canlı kültürleri antimikrobiyal bileşikler olarak kullanılabilir (Sjögren vd., 2003; Salomskiene1 vd., 2019).

Petrilere dökülmüş Müller Hinton agar üzerine 0.5 Mc Farland’a göre ayarlanmış test bakterilerinden 100 µl olacak şekilde yayma ekim tekniği kullanılarak ekim yapılmıştır. Sonrasında üzerine açılan kuyucuklar içerisine McFarland’ı 0.5 (10⁸ kob/mL) bulanıklığa ayarlanan LAB izolat kültürlerinden 100 µl alınarak her kuyucuğa

koyulmuştur. Pozitif kontrol olarak kloramfenikol kullanılmıştır. 24 saat etüvde inkübe edildikten sonra oluşan zon çapı ölçülerek aktivite değerlendirilmiş ve Çizelge 4.12' de LAB izolatlarının antimikrobiyal aktivite sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.12. LAB izolatlarının test bakterileri üzerinde oluşturduğu zon çapları

Test Bakterileri	İzolat Kodları							
	1.3.1 (F)	1.4.1 (F)	1.4.2 (F)	1.4.3 (F)	2.A.4 (F)	2.4.3 (F)	2.4.5 (F)	Kloramfenikol
<i>L. monocytogenes</i>	18mm	14mm	15mm	13mm	15mm	13mm	12mm	13mm
<i>P. aeruginosa</i>	14mm	10mm	9mm	Dirençli	8mm	14mm	12mm	9mm
<i>B. subtilis</i>	15mm	12mm	14mm	17mm	16mm	17mm	14mm	12mm
<i>B. cereus</i>	12mm	13mm	12mm	17mm	14mm	14mm	11mm	11mm
<i>S. typhimurium</i>	10mm	8mm	12mm	9mm	14mm	11mm	10mm	14mm
<i>K. pneumoniae</i>	15mm	18mm	16mm	19mm	16mm	12mm	8mm	17mm
<i>E. coli 35218</i>	18mm	12mm	14mm	12mm	11mm	15mm	15mm	15mm
<i>E. coli 25922</i>	13mm	12mm	8mm	12mm	9mm	14mm	9mm	11mm
<i>S. aureus</i>	9mm	12mm	Dirençli	8mm	Dirençli	8mm	8mm	9mm
<i>E. faecalis</i>	8mm	12mm	10mm	7mm	Dirençli	12mm	7mm	8mm

4.3.7.2. Mikrobrot dilüsyon metodu sonuçları

LAB postbiyotiklerinin antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmek amacıyla yapılan çalışmamızda her bir izolatın liyofilize edilmiş süpernatantı kullanılmıştır.

Yapılan bir çalışmada mango turşusundan izole edilen 5 LAB suşunun antibakteriyel aktivitesi, çalışmamızda olduğu gibi LAB' ların hücresiz süpernatantları kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan LAB suşlarının hepsinde, test edilen patojenlere karşı antibakteriyel aktivitenin olduğu gözlemlenmiştir (Mohamad vd., 2019).

100 mg/mL konsantrasyona sahip postbiyotiklerden 50 µl alınarak üzerine 3 mL DPPH (2×10^{-2} g/l) çözeltisi ilave edilmiş ve vortekslenmiştir. Referans madde olarak BHT (butilhidroksitoluen) kullanılmış ve aynı protokol uygulanmıştır. 30 dk karanlıkta inkübe edilmişlerdir. Sonrasında 517 nm dalga boyuna ayarlanmış spektrofotometrede absorbans değerleri okunmuş ve % inhibisyon olarak serbest radikal süpürücü etki değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.14' de LAB izolat postbiyotiklerinin DPPH ile serbest radikal süpürücü etki sonuçları % aktivite olarak verilmiştir. Bu sonuçlara göre izolatlardan elde edilen postbiyotiklerden en yüksek % antioksidan etkiye sahip postbiyotik izolatının %88.8 ile 2.4.3 (FLS) olduğu görülmüştür

LAB' lar, antioksidatif aktivitelerini farklı mekanizmalarla gerçekleştirirler. Probiyotik mikroorganizmaların hücre yüzey yapıları, ürettikleri organik asitler (laktik asit, asetik asit), proteolitik aktiviteleri ve kısa zincirli yağ asitleri gibi özelliklerinin serbest radikal oluşumunu azalttığı, antioksidan aktiviteyi arttırdığı bilinmektedir (Cheng, vd., 2009).

Çizelge 4.14. LAB izolat postbiyotiklerinin % antioksidan aktivitesi

Kod numarası	% Antioksidan Aktivite
1.3.1 (FLS)	86.2
1.4.1 (FLS)	85.4
1.4.2 (FLS)	85.7
1.4.3 (FLS)	85.1
2.A.4(FLS)	85.1
2.4.3 (FLS)	88.8
2.4.5 (FLS)	86.7
BHT	36.2

4.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

48 saat inkübasyona bırakılan LAB izolatları santrifüj edilmiştir. Steril şartlarda mikrofiltrasyon yolu ile sterilize edilen süpernatantlarda mikroorganizma varlığı besiyerlerine süpernatantların geri eklmesiyle kontrol edilmiş ve herhangi bir üreme gözlenmemiştir. Belirtildiği şekilde ekimleri yapılan LAB izolatlarının süpernatantları ayrıca liyofilize edilmiş ve hücre kültürü çalışmalarında LAB izolatlarının liyofilize postbiyotikleri örnek olarak kullanılmıştır.

Yöntem kısmında belirtildiği gibi madde konsantrasyon miktarları liyofilize postbiyotikler için; 20, 15, 10, 5 mg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde çalışmalar yapılmıştır.

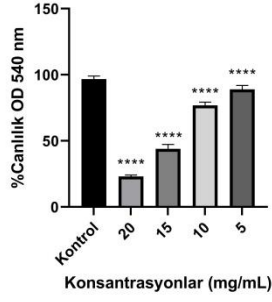
4.4.1. MTT yöntemi ile LAB liyofilize postbiyotiklerinin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

Çalışmada 96 kuyucuklu mikropalakalara 100 µl taze DMEM besiyeri içerisinde kuyu başına 1×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücreler gece boyunca inkübasyona bırakıldıktan sonra postbiyotik konsantrasyonları verilmiştir. Ters çevrilerek besiyeri uzaklaştırılan hücrelere 100 µl besiyeri içerisinde 20, 15, 10, 5 mg/mL konsantrasyonlarda liyofilize postbiyotik içerecek şekilde uygulama yapılmıştır. Her madde için kontrol olarak sadece DMEM besiyeri eklenen kuyucuklar oluşturulurken, pozitif kontrol olarak doksorubisin 50,15, 10 ve 5 µM/mL ve negatif kontrol olarak ise; MRS besiyeri uygulanmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda MTT boyası verilerek 4 saat inkübe edilmiştir. DMSO ile formazan tuzlarının çözünmesi sağlanmıştır.

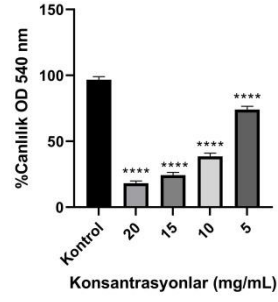
Caco-2 ATCC HTB-37 hücreleri ile LAB postbiyotikleri için yapılan MTT sonuçları ELISA okuyucu cihaz yardımı ile 540 nm dalga boyunda okunmuştur. Okunan absorbans değerleri canlı hücre miktarı olarak kabul edilmiş ve elde edilen veriler Microsoft Office Excel % programında yüzde canlılık değerlerine çevrilmiştir. 3 tekrarlı bağımsız yapılan deneylerin sonuçlarında, kontrol grubunun ortalaması 100 olarak kabul edilerek diğer bütün konsantrasyonların % değerleri bu değere göre hesaplanmıştır. Elde edilen veriler GraphPad Prism 9.0 programı kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiş ve hücre canlılık grafikleri oluşturulmuştur. Caco-2 hücre hattının LAB liyofilize postbiyotik gruplarına ait % canlı hücre-konsantrasyon grafikleri görsel 4.13'te verilmiştir.

Sonuç olarak 1.3.1 (FLS), 1.4.1 (FLS), 1.4.2 (FLS), 1.4.3 (FLS), 2. A.4 (FLS), 2.4.3 (FLS), 2.4.5(FLS) liyofilize postbiyotiklerinin Caco-2 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etki IC_{50} değerleri görsel 4.17' de belirtildiği gibi sırasıyla, 15, 9.4, 12, 15.5, 13.7, 12.8, 8.6 mg/mL olarak bulunmuştur.

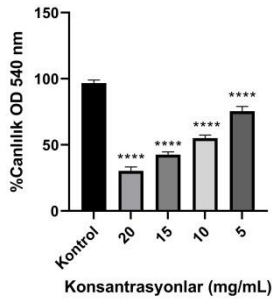
1.3.1 (FLS) Caco-2 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi



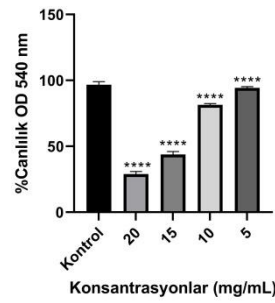
1.4.1 (FLS) Caco-2 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi



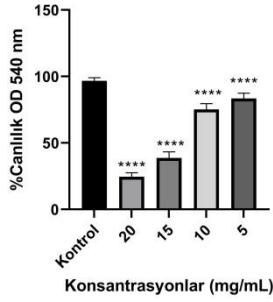
1.4.2 (FLS) Caco-2 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi



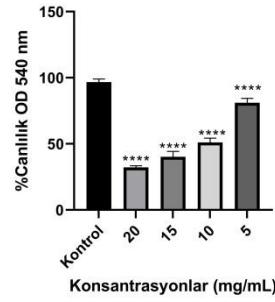
1.4.3 (FLS) Caco-2 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi



2.A.4 (FLS) Caco2 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi

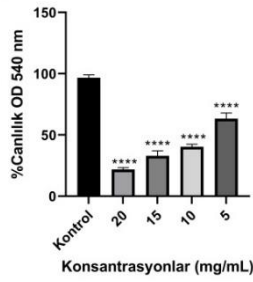


2.4.3 (FLS) Caco-2 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi

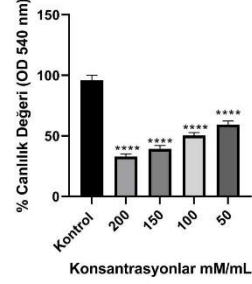


Görsel 4.13. Liyofilize postbiyotiklerin Caco-2 hücre hattı üzerindeki % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (**** $p < 0.0001$ $n=8$)

2.4.5 (FLS) Caco-2 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi



Doksorubisin Caco-2 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi



Görsel 4.13.(Devam) Liyofilize postbiyotiklerin Caco-2 hücre hattı üzerindeki % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (**** $p < 0.0001$ $n=8$)

Çizelge 4.15. Liyofilize postbiyotiklerin konsantrasyonlarına bağlı Caco-2 hücre canlılıkları

Konsantrasyonlar	Liyofilize Süpernanant Kodları ve % Canlılıkları						
	1.3.1 (FLS)	1.4.1 (FLS)	1.4.2 (FLS)	1.4.3 (FLS)	2.A.4 (FLS)	2.4.3 (FLS)	2.4.5 (FLS)
20 mg/mL	23	18	30	29	24	32	22
15 mg/mL	44	24	43	44	39	40	33
10 mg/mL	77	39	55	81	75	51	40
5 mg/mL	89	74	75	94	83	81	63

Çizelge 4.16. Liyofilize postbiyotiklerin IC_{50} değerleri (mg/mL)

FLS Kod Numarası	IC_{50} Konsantrasyonları
1.3.1 (FLS)	15
1.4.1 (FLS)	9.4
1.4.2 (FLS)	12
1.4.3 (FLS)	15.5
2.A.4(FLS)	13.7
2.4.3 (FLS)	12
2.4.5 (FLS)	8.6
Doksorubisin	120.36 μ M/mL

4.4.2. AnnexinV-PI yöntemi kullanılarak akış sitometride Caco-2 hücre hattında LAB liyofilize postbiyotiklerinin apoptotik etkilerinin değerlendirilmesi

Annexin V proteini floresan bir madde ile işaretlenerek apoptotik hücrenin görünür hale gelmesi sağlarken, Propidium iyodid (PI) direkt olarak DNA veya çift sarmallı RNA moleküllerine bağlanabilir, ölü ve hasar görmüş hücrelerin hücre membran yapısının bozulmuş olması nedeniyle bu bağlanma gerçekleşir. Sağlıklı hücrelerde bu bağlanma gerçekleşmez. Bu özellik sayesinde PI geç apoptoz ve ölüm

evresindeki hücrelerin görünmesini sağlamaktadır (Gatti vd., 1998; Kopman vd., 1994; van England vd., 1998).

Çalışmamızda Annexin V Apoptosis Detection Kit protokolü uygulanmıştır. 6 kuyucuklu plakalara 1×10^5 hücre/kuyucuk sayıda ekimleri yapılan hücrelerin 24 saat inkübasyonun ardından liyofilize postbiyotik örnekleri MTT testiyle belirlenen IC_{50} konsantrasyonlarında uygulanmış ve 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler plakalardan kaldırılarak santrifüj edilmiştir. Pellet 2 kez soğuk PBS eklenerek yıkanmıştır. Yıkama sonrası pellet PBS içerisinde resüspanse edilmiştir. Ependorflara 5 μ l Annexin V ve 5 μ l PI boya konmuştur. Üzerine PBS ile resüspanse edilen hücrelerden 100 μ l eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda ependorflara 1X Annexin V bağlanma tamponu eklenmiş ve akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) okumaları yapılmıştır.

Boyanan hücrelerden; canlı olanlar FITC-, PE-, erken apoptotik olanlar FITC+, PE-, geç apoptotik olanlar FITC+, PE+ ve nekrotik olan hücreler ise FITC-,PE+ olarak değerlendirilmiştir (Dikmen vd., 2011).

Bu bilgilere dayanarak LAB liyofilize postbiyotiklerinin Caco-2 hücre hattındaki apoptotik etkieri çizelge 4.18' de sunulmuştur.

Çizelge 4.17. LAB liyofilize postbiyotiklerinin Caco-2 hücre hattındaki apoptotik etkisinin belirlenmesi

Kod Numarası	Canlı %	Nekroz %	Erken apoptoz %	Geç apoptoz %
Kontrol	97.5	2.4	0	0.1
1.3.1 (FLS)	75.9	10.8	1.1	12.2
1.4.1 (FLS)	79.1	9.9	1.8	9.3
1.4.2 (FLS)	79.7	8.9	1.2	10.2
1.4.3 (FLS)	81.7	10.5	0	0.1
2.A.4(FLS)	76.8	9.6	1.4	12.2
2.4.3 (FLS)	89.2	10.5	0	0.3
2.4.5 (FLS)	75.1	9.9	1.7	13.2
Doksorubisin	75.5	6.3	6.1	12.1

Elde edilen sonuçlara göre; Annexin-V–PI ile boyanan Caco-2 hücrelerinde kontrol grubunun canlı hücreleri %97.5; iken nekroza uğrayan hücreler %2.4, geç apoptoza uğrayan hücrelerin ise %0.1 ve erken apoptozda isesıfır olarak bulunmuştur.

Caco-2 hücrelerinin 24 saat 1.3.1(FLS) liyofilize postbiyotik ile (IC₅₀: 15 mg/mL) inkübe edilmesi sonucu canlı hücrelerin toplam hücrelerin %75.9' u iken nekroza uğrayan hücreler %10.8, erken apoptoza uğrayan hücreler %1.1 ve geç apoptoza uğrayan hücreler ise %12.2' dir. Bu durumda apoptotik hücreler toplam hücrelerin %24,1'ini oluşturmaktadır.

Caco-2 hücrelerinin 24 saat 1.4.1(FLS) liyofilize postbiyotik ile (IC₅₀: 9.4 mg/mL) inkübe edilmesi sonucu canlı hücrelerin toplam hücrelerin %79.1'i iken nekroza uğrayan hücreler %9.9 erken apoptoza uğrayan hücreler %1.8 ve geç apoptoza uğrayan hücreler ise %9.3 tür. Bu durumda apoptotik hücreler toplam hücrelerin %20.9' unu oluşturmaktadır.

Caco-2 hücrelerinin 24 saat 1.4.2(FLS) liyofilize postbiyotik ile (IC₅₀: 12 mg/mL) inkübe edilmesi sonucu canlı hücrelerin toplam hücrelerin %79.7'i iken nekroza uğrayan hücreler %8.9 erken apoptoza uğrayan hücreler %1.2 ve geç apoptoza uğrayan hücreler ise %10.2' dir. Bu durumda apoptotik hücreler toplam hücrelerin %20.3' ünü oluşturmaktadır.

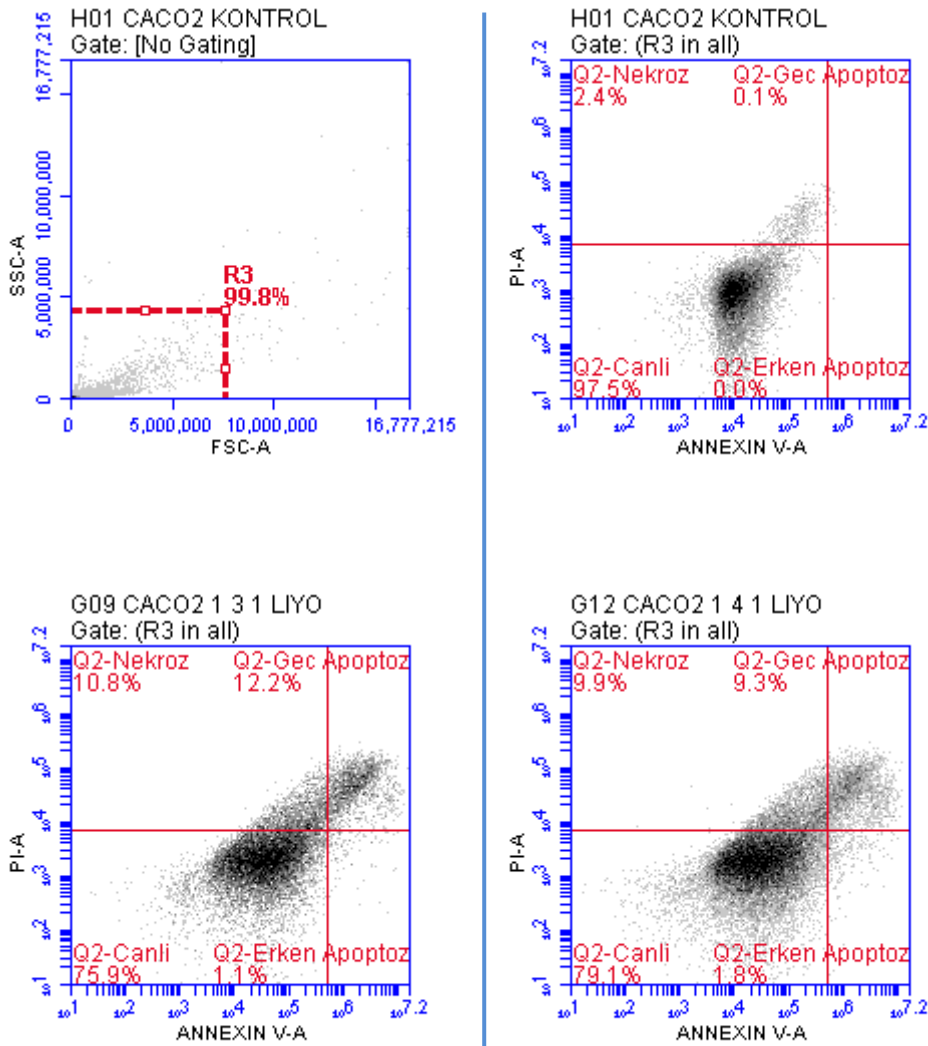
Caco-2 hücrelerinin 24 saat 1.4.3(FLS) liyofilize postbiyotik ile (IC₅₀: 15.5 mg/mL) inkübe edilmesi sonucu canlı hücrelerin toplam hücrelerin %79.1'i iken nekroza uğrayan hücreler %10.8 erken apoptoza uğrayan hücreler %1.1 ve geç apoptoza uğrayan hücreler ise %12.2' dir. Bu durumda apoptotik hücreler toplam hücrelerin %20.9' unu oluşturmaktadır.

Caco-2 hücrelerinin 24 saat 2.A.4(FLS) liyofilize postbiyotik ile (IC₅₀: 13.7 mg/mL) inkübe edilmesi sonucu canlı hücrelerin toplam hücrelerin %76.8'i iken nekroza uğrayan hücreler %9.6 erken apoptoza uğrayan hücreler %1.4 ve geç apoptoza uğrayan hücreler ise %12.2' dir. Bu durumda apoptotik hücreler toplam hücrelerin %23.2' sini oluşturmaktadır.

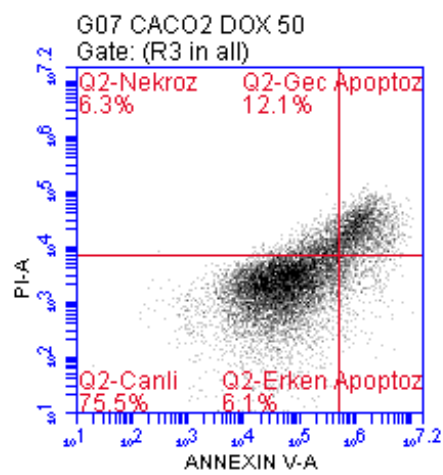
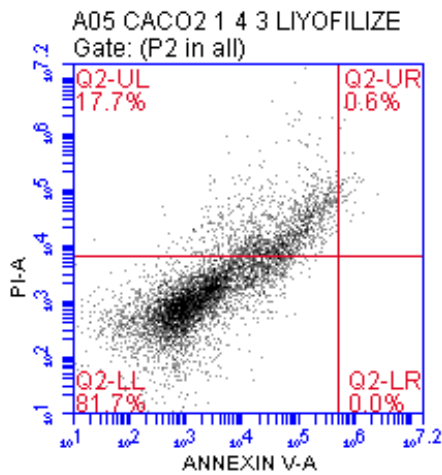
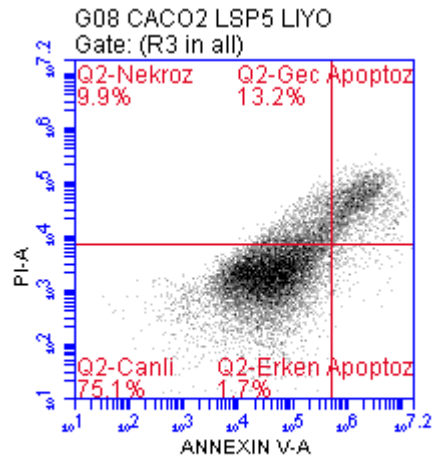
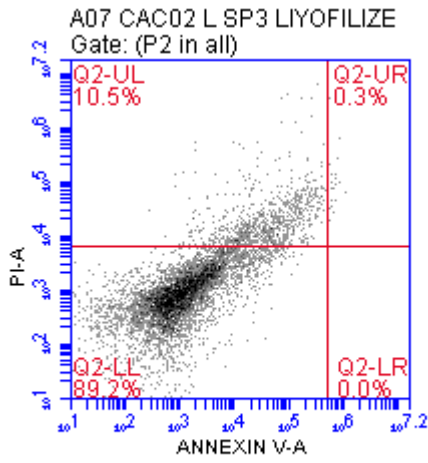
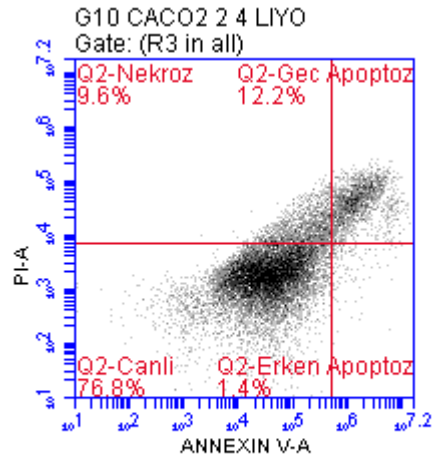
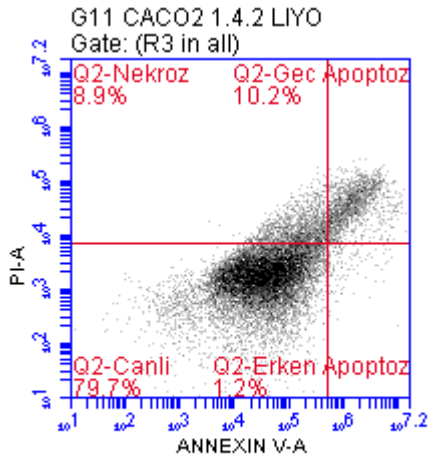
Caco-2 hücrelerinin 24 saat 2.4.3(FLS) liyofilize postbiyotik ile (IC₅₀: 12.8mg/mL) inkübe edilmesi sonucu canlı hücrelerin toplam hücrelerin %79.7'si iken nekroza

uğrayan hücreler %8.9 erken apoptoza uğrayan hücreler %1.2 ve geç apoptoza uğrayan hücreler ise %10.2' dir. Bu durumda apoptotik hücreler toplam hücrelerin %20.3' ünü oluşturmaktadır.

Caco-2 hücrelerinin 24 saat 2.4.5(FLS) liyofilize postbiyotik ile (IC₅₀: 8.6 mg/mL) inkübe edilmesi sonucu canlı hücrelerin toplam hücrelerin %75.1'i iken nekroza uğrayan hücreler %9.9 erken apoptoza uğrayan hücreler %1.7 ve geç apoptoza uğrayan hücreler ise %13.2' dir. Bu durumda apoptotik hücreler toplam hücrelerin %24.9'unu oluşturmaktadır.



Görsel 4.14. Liyofilize LAB postbiyotiklerinin Caco-2 hücre hattındaki apoptotik etkisinin Annexin-V – PI yöntemi ile akış sitometride değerlendirilmesi



Görsel 4.14. (Devam) Liyofilize LAB postbiyotiklerinin Caco-2 hücre hattındaki apoptotik etkisinin Annexin-V – PI yöntemi ile akış sitometride değerlendirilmesi

Yapılan bir çalışmada farklı LAB süpernatantlarının HT-29 kanser hücresi üzerinde sitotoksik etkilerinin suşa bağlı farklılıklar gösterdiğini ve LAB süpernatantlarının HT-29 kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisinin olduğu görülmüştür (Haghshenas vd., 2015).

4.4.3. 16S rRNA Dizi Analizi ile Genotipik Karakterizasyonların Belirlenmesi

16S rRNA gen dizilimine göre; Sanger dizileme ile elde edilen okumalar, bir konsensüs dizi oluşturmak amacıyla kontig haline getirilmiştir. Bu işlemin gerçekleştirilmesinde BioEdit yazılımı içinde CAP contig assembly algoritması kullanılmıştır. Diziler NCBI (National Center for Biotechnology Information) üzerinden karşılaştırılarak en yakın türler belirlenmiştir. Benzerlik Oranları: %99.84-%100 olarak bulunmuş ve beş türde *Lactocaseibacillus rhamnosus* olarak belirlenmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda düşük kaliteli gıda alımı ve modern yaşamın getirdiği hareketsiz yaşam tarzı, insan sağlığının bozulmasının nedenlerindedir. Bu modern yaşam tarzı, bağırsak mikrobiyotasında disbiyozu neden olur ve bu meydana gelen disbiyoz durumunda önde gelen sağlık sorunlarından biride kanserdir. Kolorektal kanser (KK) en yaygın kanserlerden biridir. Batı ülkelerindeki artışla KK insidansının 2030 yılına kadar dünya genelinde 1.1 milyon ölüm ve 2.2 milyon vakaya yükseleceği tahmin edilmektedir. Kemoterapi ve radyasyona maruz kalma genellikle ciddi yan etkiler ve hastaların yaşam kalitesinde bozulmaya sebep olabilmektedir. Bu olumsuzluklar, araştırmacıları kanseri tedavi etmek için uygun maliyetli ve daha az yan etkileri olan alternatif tedaviler aramaya teşvik etmektedir. Bu çalışmalar içerisinde probiyotik mikroorganizmalar konak üzerindeki etkileri düşünüldüğünde önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir.

Tez kapsamında; 21 gün fermente edilmiş kolostrumdan laktik asit bakterilerinin izolasyonu, klasik ve moleküler yöntemlerle tanımlanması, otoagregasyon ve koagregasyon yetenekleri, biyofilm oluşturma yetenekleri, antibiyotik duyarlılıkları, antimikrobiyal aktivite testleri, laktik asit üretimi, hemolitik aktiviteleri, pH, tuz, safra tuzu ve asit dirençleri ve Caco-2 hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla öncelikle; izole edilen laktobasil suşlarından probiyotik olduklarını belirlediğimiz laktobasillerin probiyotik olma özellikleri taranmış, bu özelliklere sahip olan laktobasil suşlarının kültür süpernatantları liyofilize edilerek elde edilen postbiyotiklerin biyolojik aktiviteleri belirlenmiştir. Literatür taramalarında LAB'ların genel özellikleri; gram pozitif, katalaz negatif, hareketsiz, spor oluşturmeyen, aside dayanıklı, basil, kok ve koko-basil morfolojisine sahip ve NaCl içeren ortamlarda üreyebildikleri göz önüne alınarak eleme işlemi gerçekleştirilmiştir (Hofvendahl vd., 2000; O'Sullivan vd., 2002).

Çalışmamızın ilk aşamasında bu özelliklere bakılarak 52 izolattan gram boyama ve katalaz testi uygulanmış sonucunda spor oluşturmeyen, gram pozitif (+) ve katalaz negatif (-) basil olan 11 izolatla çalışılmıştır. Bu izolatlara farklı pH' da gelişim, farklı tuz konsantrasyonlarında gelişim, TSI da üreme, hareketlilik ve hidrojen sülfür oluşumu oluşumu testleri uygulanmış ve 11 izolattan LAB özelliği taşıyan 7 adet basil

morfolojiye sahip izolat elde edilmiştir. Pektaş'ın çalışmasında da 136 LAB izolatlarından hepsinin H₂S üretmediği bildirilmiştir (Pektaş, 2014). Deney sonuçları çizelge 4.4' te ayrıntılı olarak verilmiştir.

Çalışmamızın sonraki aşamasında probiyotik özelliklerin belirlenmesi amaçlanmış olup bu 7 izolata hemolitik aktivite, asitte ve safra tuzunda üreme, koagregasyon ve otoagregasyon yeteneklerinin belirlenmesi, biyofilm oluşturma yetenekleri, laktik asit üretim miktarlarının tayini, antibiyotik duyarlılıklarının test edilmesi, serbest radikal süpürücü etkilerinin belirlenmesi gibi testler çalışılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre; 7 izolatın da γ -hemolitik aktiviteye sahip olduğu, tüm izolatların asit ve safra tuzuna dirençli olduğu belirlenmiştir. Laktobasiller üzerinde hemolitik aktivitenin belirlendiği birçok çalışmada ve Talib ve diğerlerinin çalışmalarında da laktobasillerin γ -hemolitik aktiviteye sahip olduğunu belirtilmiştir (Talib, vd., 2019). Asit ve safra tuzuna karşı dayanıklılık için yapılan çalışmalarda LAB' ların probiyotik olarak kabul edilmeleri için asit ve safra tuzuna dayanıklı olmaları gerektiği bildirilmiştir (Saboori vd., 2022, Plessas vd., 2017).

Koagregasyon ve otoagregasyon özellikleri bakımından LAB izolatlarının agregasyon yeteneğine sahip olması, hücrelere yapışma ve kolonizasyonu sağlamak açısından probiyotik özellikler bakımından öneme sahiptir. Hüresel yapışma kabiliyeti konakçı hücre ile bakteri arasındaki etkileşimi etkilemektedir. Bunun, probiyotik özelliklerin gösterilebilmesi için gereken hücre miktarına ulaşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Otoagregasyon *in vitro* kolonizasyonunu ve *in vivo* olarak da bir probiyotik GIS' te kalıcılığını arttırmaktadır. Patojen mikroorganizmalar ile probiyotik bakterilerin koagregasyon yeteneğinde olması, enfeksiyonlardan korunmayı kolaylaştırmaktadır (Goh ve Klaenhammer, 2010; Okochi vd., 2017). Otoagregasyon ve koagregasyon yeteneklerine göre; LAB izolatlarının otoagregasyon değerleri 1.4.1 (FLS) %3,8 ile 1.4.2 (FLS) %46.22 arasındaki olduğu belirlenmiştir. Koagregasyon değerleri açısından ise; izolatlardan *E. coli* ATCC 35298 test bakterisi üzerinde en düşük %34.4 olarak 2.4.3(F) izolatında görülürken, en yüksek koagregasyon değeri %64.5 olarak 2.A.4(F) izolatında bulunmuştur. İzolatlardan *S. aureus* ATCC 25923 test bakterisi üzerinde en düşük %36.2 olarak 1.4.3 (F) izolatında görülürken, en yüksek koagregasyon değeri %73.7 olarak 2.4.5 (F) izolatında bulunmuştur. Elde edilen

koagregasyon sonuçlarına göre; tüm izolatların koagregasyon yeteneklerinin olduğu belirlenmiştir.

Biyofilm oluşturma kabiliyeti açısından değerlendirilen LAB izolatlarında farklı sonuçlar elde edilmiştir. İzolatların biyofilm oluşturma yetenekleri 1.3.1 (F), 1.4.1 (F), 1.4.2 (F), 1.4.3 (F), 2. A.4 (F), 2.4.3 (F), 2.4.5 olacak şekilde sırasıyla “zayıf, orta, güçlü, zayıf, zayıf, zayıf, orta” olarak belirlenmiştir. Biyofilm oluşumu gözlenen LAB’ lar içerisinde ise daha çok “zayıf biyofilm üreten” suşların olduğu sonucuna varılmıştır. Arena ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada LAB’ ların bağırsak yüzeylerine tutunma yeteneklerinin genetik olarak pili varlığı ile karakterize edildiği bildirilmektedir (Arena vd., 2017). Er’ in yapmış olduğu çalışmada ise; 138 izolattan 77 tanesinin biyofilm oluşturmadığı (-), 26 tanesinin zayıf derecede (+), 12 izolatın orta derecede (++) ve 23 izolatın ise yüksek derecede (+++) biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir (Er, 2016).

Laktik asit üretim miktarlarının belirlendiği deney sonuçlarında en yüksek laktik asit üretimi %2.52 laktik asit miktarı ile 2.4.3(F) kod numaralı LAB izolatı iken, %2.16 laktik asit miktarı ile 2.4.5(F) kod numaralı LAB izolatı en düşük miktarda laktik asit üretme yeteneğine sahip olduğu görülmüştür. Laktik asit üretimi ortam pH’ sını düşürerek asidik bir ortam oluşturmaktadır ve bu sayede patojen bakterilerin üremesine engel olmaktadır.

LAB’lerinin laktik asit üretim miktarlarının araştırıldığı çalışmalarda her LAB suşunun kendine özgü miktarda laktik asit ürettiği bildirilmiştir. LAB’ların probiyotik özellikleri suşa özgüdür, her suşa göre değişkenlik göstermektedir (Monteagudo-Mera vd., 2012).

Serbest radikal süpürücü etki bakımından değerlendirilen LAB izolatlarının liyofilize postbiyotikleri ile yapılan % antioksidan aktivite deney sonuçları 1.3.1 (FLS), 1.4.1 (FLS), 1.4.2 (FLS), 1.4.3 (FLS), 2. A.4 (FLS), 2.4.3 (FLS), 2.4.5 (FLS) olacak şekilde sırasıyla %86.2, %85.4, %85.7, %85.1, %85.1, %88.8, %86.7 olarak hesaplanmıştır.

LAB’ ların antioksidan aktivitesinin bulunmasının probiyotik olma açısından önemli olduğu düşünülmektedir ve LAB’ ların hücre yüzey yapılarının laktik asit, asetik asit gibi ürettikleri organik asitlerin ve SCFA’ ların serbest radikal oluşumunu azalttığı

bilinmektedir. (Cheng vd., 2009; Wang vd., 2017). Diker' in yaptığı çalışmada *L. rhamnosus* suşlarının antioksidan aktivite değerleri %51-88 arasında, ortalama %72.4 olarak bulunmuştur (Diker, 2019).

Antibiyotik duyarlılıkları açısından test edilen LAB izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları ise şöyledir; tüm LAB izolatlarının Kanamisin sülfat 8324 ve vankomisine dirençli olduğu gözlenirken, Nifuroksazid, Aminopenisilin G ve Streptomisin 56501 antibiyotiklerine karşı yüksek oranda dirençli oldukları gözlenmiştir. Novobiosin, Kloramfenikol, Siproflaksasin, Sefalotin C4520' e 1-8 µg/mL konsantrasyon aralığında değişkenlik göstermekle birlikte, Ampisilin, Penisilin G, Eritromisin E6376, Eritromisin A2275' e duyarlı oldukları belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda laktobasillerin; basitrasin, gentamisin, siprofloksasin, kanamisin, streptomisin ve vankomisine karşı yüksek derecede doğal dirence sahip oldukları, penisilin ve ampisilin gibi hücre duvarı sentezini inhibe eden antibiyotiklere karşı ise duyarlı oldukları bildirilmiştir (Danielsen ve Wind, 2003; Shao vd., 2015).

Çalışmalarımız kapsamında kolostrumdan izole ettiğimiz probiyotik özellikleri taşıyan 7 LAB izolatının antimikrobiyal etkileri belirlenmiştir. Bu 7 izolatın liyofilize süpernatantları postbiyotik olarak kullanılmış ve mikrobroth dilüsyon yöntemiyle MİK değerleri belirlenmiştir.

MİK değerleri çizelge 4.14' te belirtildiği gibi *E.coli ATCC 35218* suşuna karşı tüm liyofilize süpernatantların 15 mg/mL konsantrasyonda etkili olduğu, *S.aureus ATCC 25923* suşuna karşı 1.4.2(FLS) ve 2.A.4(FLS) kodlu LAB liyofilize postbiyotikleri etkisiz olurken, 1.4.1(FLS) ve 1.4.3(FLS) kodlu LAB liyofilize postbiyotikleri 15 mg/mL konsantrasyonda etkili olduğu ve diğer LAB liyofilize postbiyotiklerinin ise 20 mg/mL konsantrasyonunda etkili olduğu, *E.faecalis ATCC 51299* suşuna karşı 1.3.1(FLS), 1.4.1(FLS) ve 2.4.3(FLS) kodlu LAB liyofilize postbiyotiklerinin 5mg/mL konsantrasyonda etkili olduğu ve diğer izolatların ise 10 mg/mL konsantrasyonunda etkili olduğu, *P. aeruginosa ATCC 27853* suşuna karşı 1.4.2(FLS), 1.4.3(FLS), 2.A.(FLS), 2.4.3 (FLS) kodlu LAB liyofilize postbiyotikleri etkisiz olurken, 1.4.1(FLS) kodlu LAB liyofilize postbiyotiğinin 20 mg/mL konsantrasyonda etkili olduğu ve diğer LAB liyofilize postbiyotiklerinin ise 25 mg/mL konsantrasyonunda etkili olduğu, *L.monocytogenes ATCC 764* suşuna karşı 1.3.1(FLS), 1.4.3(FLS) ve 2.4.5(FLS) kodlu LAB liyofilize postbiyotiklerinin 15mg/mL konsantrasyonda etkili olduğu ve diğer

izolatların ise 20 mg/mL konsantrasyonunda etkili olduğu, *S.typhimurium* ATCC B-4420 suşuna karşı 1.4.2(FLS) ve 2.4.5 (FLS) kodlu LAB liyofilize postbiyotiklerinin etkisiz olurken, 13.1(FLS) kodlu LAB liyofilize postbiyotiğinin 15 mg/mL konsantrasyonda etkili olduğu ve diğer LAB liyofilize postbiyotiklerinin ise 20 mg/mL konsantrasyonunda etkili olduğu, *K.pneumoniae* ATCC 700603 suşuna karşı ise 1.4.2(FLS), 1.4.3(FLS) ve 2.4.3 (FLS) kodlu LAB liyofilize postbiyotiklerin etkisiz olurken, diğer LAB liyofilize postbiyotiklerinin ise 20 mg/mL konsantrasyonunda etkili olduğu belirlenmiştir.

Lactobacillus suşlarının antimikrobiyal aktivitelerinin, değişen antipatojen maddelerin sentezlenmesine bağlanabildiği bilinmektedir. Bu maddeler bakteriyosinler, H₂O₂ ve organik asitler (laktik ve asetik asitler) gibi farklı maddeler olabilmektedir. Probiyotiklerin sağlık yararları arasında patojenleri inhibe etme özelliği en önemli özellikleri olarak kabul edilmektedir (Giraffa vd., 2010; Cizeikiene vd., 2013).

Haghshenas ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada 17 LAB izolatının 15' tanesinin orta düzeyde antimikrobiyal aktivite gösterdiği, iki izolatın (*L. paracasei* 19M ve *L. casei* 25C) herhangi bir antagonistik aktivite göstermediği belirlenmiştir (Haghshenas vd., 2015).

LAB liyofilize postbiyotik konsantrasyonlarının sitotoksik etkileri Caco-2 hücre hattı üzerinde MTT yöntemiyle belirlenmiş ve IC₅₀ değerleri çizelge 4.17' de verilmiştir. LAB liyofilize postbiyotiklerinin IC₅₀ değerleri 1.3.1 (FLS) ,1.4.1 (FLS), 1.4.2 (FLS), 1.4.3 (FLS), 2.A.4(FLS), 2.4.3 (FLS) ve 2.4.5 (FLS) için sırasıyla 15.065 mg/mL, 9.48 mg/mL, 12.07 mg/mL, 15.520 mg/mL,13.72 mg/mL, 12.856 mg mg/mL ve 8.657 mg/mL olarak belirlenmiştir.

Daha çok geç apoptoz da etkili olduğu görülen LAB liyofilize postbiyotiklerinin apoptotik etkileri çizelge 4.18' de ayrıntılı olarak verilmiştir. Caco-2 hücrelerinin 24 saat liyofilize postbiyotikler ile (IC₅₀) muamele edilmesi sonucu; 1.3.1(FLS) postbiyotiğinin hücrelerin %24.1' de apoptoza neden olduğu, 1.4.1 (FLS) postbiyotiğinin hücrelerin %20.9' de apoptoza neden olduğu, 1.4.2(FLS) postbiyotiğinin hücrelerin %20.3' de apoptoza neden olduğu, 1.4.3(FLS) postbiyotiğinin hücrelerin %20.9' da apoptoza neden olduğu, 2.A.4(FLS) postbiyotiğinin Caco-2 hücrelerinde %23.2' de apoptoza neden olduğu, 2.4.3(FLS)

postbiyotiğinin hücrelerin %20.3' de apoptoza neden olduğu, 2.4.5(FLS) postbiyotiğinin ise; %24.9' de apoptoza neden olduğu belirlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada ise; türe özgü bir şekilde aktivite gösteren bazı probiyotiklerin, tümör insidansını, tümör boyutunu ve tümör sayısını azalttığı veya kanser öncesi lezyonları (aberran kript odakları) önlediği görülmüştür. KK (kolorektal kanser)' nin önlenmesi üzerindeki etki, enflamasyonun baskılanması ve erken tümör hücrelerinin apoptozunun artırılması gibi çeşitli mekanizmalarla ilişkilendirilmiştir (Fong vd., 2020).

Yapılan birçok çalışmada probiyotik özellikli LAB' ların kanseri önleme ve tedavi etmede etkili olduğu görülmüştür ve bu tez kapsamında 7 izolattan elde edilen liyofilize postbiyotiklerin Caco-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine bakılmış ve daha sonra apoptotik etkileri incelenmiştir. 7 izolattan 5 tanesi laktik asit miktarı, antimikrobiyal aktivite, antioksidan aktivite, MTT yöntemi ve apoptozis çalışmalarında yüksek aktivite göstermiş ve *Lactacaseibacillus rhamnosus* olarak moleküler yöntemlerle tanımlanmıştır. Kolostrum, probiyotiklerin eldesi için çok değerli bir kaynaktır. İzole edilen probiyotik bakterilerin ve liyofilize postbiyotiklerin ileri moleküler yöntemler kullanılarak farklı protein ve gen düzeyinde aktiviteler açısından değerlendirilmesi gelecekte planlanan çalışmalar arasındadır. Postbiyotikler, probiyotiklere kıyasla sahip oldukları üstün özellikler nedeniyle gelecekte gıda, kozmetik ve takviye edici preparatlar olarak hayatımızda çok önemli roller üstleneceklerdir. Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar postbiyotiklerin biyolojik aktivitelerini belirleme açısından önemli bir tez olup, devamında oluşacak yeni tezler ve projeler literatüre önemli katkılar sağlayacaktır.

KAYNAKÇA

- Addis, E., Fleet, G. H., Cox, J. M., Kolak, D., and Leung, T. (2001). The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-veined cheeses. *International Journal of food Microbiology*, 69(1-2), 25-36.
- Aggeletopoulou, I., Konstantakis, C., Assimakopoulos, S.F., Triantos, C. (2019). The Role of the Gut Microbiota in the Treatment of Inflammatory Bowel Diseases. *Microb. Pathog.*, 137, 103774.
- Aguilar-Toalá, J.E., Garcia-Varela, R., Garcia, H.S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A.F., Vallejo-Cordoba, B., Hernández-Mendoza, A. (2018). Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 105-114.
- Ahi, S. (2011). *Bazı laktik asit bakterilerinin ekzopolisakkarit (EPS) üretimi ile antibiyotik dirençliliklerinin araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Akan, E., Kınık, Ö. (2014). Biyofilm oluşum mekanizması ve biyofilmlerin gıda güvenliğine etkisi. *Gıda ve Yem Bilimi - Teknolojisi Dergisi*, 14: 42-51.
- Akçelik, M., Ayhan, K., Çakır, D., Doğan, H.B., Gürgün, V., Halkman, A., Kaleli, D., Kuleasan, H., Özkaya, D.F., Tunail, N., Tükel, Ç. (2000), *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Birimi, Ankara, 2. Baskı, 229-275, 514-515.
- Akkaya, Ü., Beyaz, E.K., (2018). Nörolojik Hastalıklar ve Probiyotik-Prebiyotik Kullanımı, *Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi-BÜSBİD*, 2(2): 01-29.
- Alp, D., Kuleaşan, H. (2019). Farklı Kaynaklardan İzole Edilmiş Laktik Asit Bakterilerinin Ekzopolisakkarit Üretimi ve Kolesterol Asimilasyon Yeteneklerinin Belirlenmesi. *Gıda*, 44(2), 191-201.

- Amaretti, A., di Nunzio, M., Pompei, A., Raimondi, S., Rossi, M., Bordoni, A. (2013). Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: In vitro and in vivo activities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97, 809–817.
- Arena, M.P., Capozzi, V., Spano, G., Fiocco, D. (2017). The potential of lactic acid bacteria to colonize biotic and abiotic surfaces and the investigation of their interactions and mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101: 2641-2657.
- Axelsson, L. (2004). Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. Salminen, S., von Wright, A., Ouwehand, A. (editörler), *Lactic acid bacteria: Classification and Physiology* (s. 1-67). New York, USA: Marcel Dekker Inc.
- Balakrishna, A. (2013). In vitro evaluation of adhesion and aggregation abilities of four potential probiotic strains isolated from guppy (*Poecilia reticulata*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(5), 793-800.
- Barros, C.P., Guimarães, J.T. Esmerino, E.A., Duarte, M.C.K., Silva, M.C., Silva, R., Ferreira, B.M., Sant’Ana, A.S., Freitas, M.Q., Cruz, A.G. (2020). Paraprobiotics and Postbiotics: Concepts and Potential Applications in Dairy Products. *Curr. Opin. Food Sci.*, 32, 1–8.
- 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.
- Bautista-Gallego, J., Ferrocino, I., Botta, C., Ercolini, D., Cocolin, L., and Rantsiou, K. (2019). Probiotic potential of a *Lactobacillus rhamnosus* cheese isolate and its effect on the fecal microbiota of healthy volunteers. *Food Research International*, 119, 305- 314.
- Bernabucci, U., Basiricò, L. and Morera, P. (2012). Impact of hot environment on colostrum and milk composition. *Cellular & Molecular Biology*, 58 (1), 9-25.
- Buckley, J.D. (2002). Bovine colostrum: Does it improve athletic performance? *Nutrition*, 18 (9), 776-777.

- Butel, M.J. (2014). Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 44(1), 1-8.
- Buttar, H.S., Bagwe, S.M., Bhullar, S.K., Kaur, G. (2017). Health Benefits of Bovine Colostrum in Children and Adults. *Dairy Human Health and Disease Across the Lifespan*, 12, 3-20.
- Charteris W. P., Kelly P. M., Morelli L., Collins J. K. (1997). The role and therapeutic potential of *Lactobacillus* species in female urogenital tract infection. *Microecol. Ther.*, 26, 59–96.
- Chen, B., Tang, G., Guo, W., Lei, J., Yao, J., Xu, X. (2021). Detection of the Core Bacteria in Colostrum and Their Association with the Rectal Microbiota and with Milk Composition in Two Dairy Cow Farms. *Animals*, 11 (12), 3363.
- Cheng, K. W., Yang, R. Y., Tsou, S. C., Lo, C. S., Ho, C. T., Lee, T. C., and Wang, M. (2009). Analysis of antioxidant activity and antioxidant constituents of Chinese toon. *Journal of Functional Foods*, 1(3), 253-259.
- Cheng, Y., Ling, Z. ve Li, L. (2020). The Intestinal Microbiota and Colorectal Cancer. *Front. Immunol.*
- Claire, L., Glenn, V., Gibson, R. ve Robert, A. (2006). Carbohydrate preference, acid tolerance and bile tolerance in five strains of *Bifidobacterium*. *J. Appl. Microbiol.*, 100, 846–853.
- Çakır, İ. (2003). GDM 310 Gıda mikrobiyolojisi. Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayınları, Ankara, 55-76.
- Danielsen, M. and Wind, A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*, 82(1), 1-11.
- de Almada, C.N., de Almada, C.N., de Sant’Ana, A.S. (2018). Paraprobiotics as potential agents for improving animal health. In *Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety*, Springer International Publishing: Berlin/Heidelberg, Germany, pp. 247–268. ISBN 9783319719504.

- De Marco, S., Sichetti, M., Muradyan, D., Piccioni, M., Traina, G. Pagiotti, R., Pietrella, D. (2018). Probiotic Cell-Free Supernatants Exhibited Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity on Human Gut Epithelial Cells and Macrophages Stimulated with LPS. *Evid. Based Complementary Altern. Med.*, 1756308.
- Demirci, M. ve Gündüz, H. (1994), “*Süt Teknolojisi El Kitabı*, Hasad Yayıncılık, Ankara, 184.
- Di Cerbo, A., Palmieri, B., Aponte, M., Morales-Medina, J.C., Iannitti, T. (2016). Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli. *Journal of Clinical Pathology*, 3 (69), 187-203.
- Dikmen, M., Cantürk, Z. ve Öztürk, Y. (2011). Escitalopram Oxalate, A Selective Serotonin Reuptake Inhibitor, Exhibits Cytotoxic And Apoptotic Effects In Glioma C6 Cells. *Acta Neuropsychiatrica*, 23 (4), 173–178.
- Er, S. (2016). *Vajenden probiyotik bakterilerin izolasyonu ve bunların antikanserojen etkilerinin araştırılması*. Doktora Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- 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.
- Escamilla, J., Lane, M.A., Maitin, V. (2012). Cell-free supernatants from probiotic *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease colon cancer cell invasion in vitro. *Nutr. Cancer*, 64, 871–878.
- Falentin, H., Rault, L., Nicolas, A., Bouchard, D.S., Lassalas, J., Lambertson, P., Aubry, J.M., Marnet, P.G., Le Loir, Y., Even, S. (2016). Bovine Teat Microbiome Analysis Revealed Reduced Alpha Diversity and Significant Changes in Taxonomic Profiles in Quarters with a History of Mastitis. *Frontiers in Microbiology*, 7:480.

- Floch, M.H. (2013). Probiotic Safety and Risk Factors. *J. Clin. Gastroenterol*, 47, 375–376.
- Fong, W., Li, Q. ve Yu, J. (2020). Gut microbiota modulation: a novel strategy for prevention and treatment of colorectal cancer. *Oncogene* 39, 4925–4943
- Fuller, R. (1992). History and development of probiotics. In *Probiotics. Springer* (1-8), Dordrecht.
- Gasbarrini, G., Bonvicini, F., Gramenzi, A. (2016). Probiotics History. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 50, 116-119.
- Gismondo, M. R., Drago, L. and Lombardi, A. (1999). Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 12(4), 287-292.
- Goh, Y. J. and Klaenhammer, T. R. (2010). Functional roles of aggregation-promoting-like factor in stress tolerance and adherence of *Lactobacillus Acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Biotechnology*, 76(15), 5005-5012.
- Goldman, A.S. (2002). Evolution of the Mammary Gland Defense System and the Ontogeny of the Immune System. *Journal of Mammary Gland Biol Neoplasia*, 7 (3), 277–289.
- Grigas, J., Ruzauskas, M., Pautienius, A., Bartkiene, E., Lele, V., Starkute, V., Zavistanaviciute, P., Zokaityte, E., Bernatoniene, J., Ivanauskas, L., Jakstas, V., Stankevicius, A. (2021). Investigation of Immunomodulatory and Gut Microbiota-Altering Properties of Multicomponent Nutraceutical Prepared from Lactic Acid Bacteria, Bovine Colostrum, Apple Production By-Products and Essential Oils. *Foods*, 6 (10), 1313.
- Gulshan, K. and Moye-Rowley, W. S. (2007). Multidrug resistance in fungi. *Eukaryotic Cell*, 6(11), 1933-1942.
- Gülgör G., Özçelik F. (2014). Bakteriyosin Üreten Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Amaçlı Kullanımı. *Akademik Gıda*, 12(1): 63-68.

- Gün, İ., Ekinçi, F.Y. (2009). Biyofilmler: yüzeylerdeki mikrobiyal yaşam. *Gıda*, 34(3): 165-173.
- Haghshenas, B., Nami, Y., Haghshenas, M., Abdullah, N., Rosli, R., Radiah, D., Khosroushahi, A.Y. (2015). Bioactivity characterization of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Microbiologyopen.*, 4(5):803-13.
- Halkman, A.K. (2005). *Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları*, Basak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd. Sti. Ankara, 73–89, 250.
- Hammes, W.P., Vogel, R.F. (1995). The genus *Lactobacillus*. In: The genera of lactic acid bacteria. *Springer*, 19-54.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B.; Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., vd. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics Consensus Statement on the Scope and Appropriate Use of the Term Probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*, 11, 506–514.
- Hofvendahl, K., Hahn-Hägerdal, B. (2000), Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb. Technol.*, 26, 87–107.
- Holt, J.G., Krie, N.R., Sneath, P.H.A., Staley J.T. ve Willams S.T. (1998). *Genus Lactobacillus in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth Edition, 786-788.
- Holzapfel W.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J., Schillinger U. (2007), The American Society for Nutr., *J. Nutr.*, 137, 838-846.
- Hyršlova, I., Krausova, G., Bartova, J., Kolesar, L., Curda, L. (2016). Goat and Bovine Colostrum as a Basis for New Probiotic Functional Foods and Dietary Supplements. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 8, 56-59.
- Izuddin, W.I., Loh, T.C., Foo, H.L., Samsudin, A.A., Humam, A.M. (2019). Postbiotic *L. plantarum* RG14 improves ruminal epithelium growth, immune status and upregulates the intestinal barrier function in post-weaning lambs. *Sci. Rep.*, 9, 9938.

- Jalilsood, T., Baradaran, A., Song, A.A.L., Foo, H.L., Mustafa, S., Saad, W.Z., Yusoff, K., Rahim, R.A. (2015). Inhibition of pathogenic and spoilage bacteria by a novel biofilm-forming *Lactobacillus* isolate: a potential host for the expression of heterologous proteins. *Microbial Cell Factories*, 14(96): 1-14.
- Jobin, C. (2013). Colorectal Cancer: Looking for Answers in the Microbiota *Cancer Discov.*, 3(4), 384–387.
- Jose, N.M., Bunt, C.R., Hussain, M.A. (2015). Comparison of microbiological and probiotic characteristics of *Lactobacilli* isolates from dairy food products and animal rumen contents. *Microorganisms*, 3: 198-212.
- Kao, Y. T., Liu, Y. S. and Shyu, Y. T. (2007). Identification of *Lactobacillus* spp. in probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis. *Food Research International*, 40(1), 71-79.
- Kaplan, M., Arslan, A., Duman, H., Karyelioğlu, M., Baydemir, B., Gnar, B.B., Alkan, M., Bayraktar, A., Tosun, H.İ., Ertürk, M., Eskici, G., Duar, R.M., Henrick, B.M., Frese, S.A., Karav, S. (2022). Production of Bovine Colostrum for Human Consumption to Improve Health. *Front Pharmacol*, 12:796824.
- Kazancıgil, E. (2018). *Çeşitli tulum peynirlerinden izole edilmiş laktik asit bakterilerinin bazı teknolojik özelliklerinin belirlenmesi* (Doctoral dissertation, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü), 11-45.
- Khalid, K. (2011) An Overview of Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Biosciences*, 1(3), 1-13.
- Khodaii, Z., Ghaderian, S.M.H., Natanzi, M.M. (2017). Probiotic Bacteria and their Supernatants Protect Enterocyte Cell Lines from Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) Invasion. *Int. J. Mol. Cell. Med.*, 6, 183-189.
- Kılıç, S. (2001). *Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri Lactobacillus*, E. Ü. Ziraat Fakültesi, Süt Teknolojisi Bölümü.
- Kıran, F., Osmanağaoğlu, . (2011). Laktik asit bakterilerinin identifikasyonunda/tiplendirilmesinde kullanılan moleküler yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 27, 62-74.

- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., and Reuter, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 41(2), 103- 125.
- 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.
- Kos, B. V., Suskovic, Z. E., Vukovic J., Simpraga, M., Frece, J., and Matosic, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 94(6), 981-987.
- La Fata, G., Weber, P., Mohajeri, M.H. (2017). “Probiotics and the Gut Immune System: Indirect Regulation,” *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(1) 11-21.
- Lalanne, G. M., Espinoza, Y. R., Sánchez, H. H. (2012). *Lactobacillus Plantarum: An Overview With Emphasis in Biochemical And Healthy Properties*. Campos A. I. P., Mena A.L. *Lactobacillus Classification, Uses And Health Implications*. 1-35.
- Leroy, F., Falony, G., Vuyst, L.d. (2008). Latest Developments in Probiotics. In: F. Toldrá, (Ed.), *Meat Biotechnology* (217-229). New York: Springer.
- 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.
- Lima, S.F., Teixeira, A.G.V., Lima, F.S., Ganda, E.K., Higgins, C.H., Oikonomou, G., Bicalho, R.C. (2017). The Bovine Colostrum Microbiome and Its Association With Clinical Mastitis. *Journals of Dairy Science*, 4 (100), 3031-3042.
- Lindner, J., Santarelli, M., Yamaguishi, C.T., Soccol, C.R., Neviani E. (2011). Recovery and Identification of Bovine Colostrum Microflora Using

- Traditional and Molecular Approaches. *Food Technology & Biotechnology*, 49 (3), 364–368.
- Ljungh, A. and Wadstrom, T. (2006). Lactic acid bacteria as probiotics. *Current issues in Intestinal Microbiology*, 7(2), 73-90.
- 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.
- Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products. *Int. Dairy J.*, 16; 189-199.
- Marsh, P.D. ve Martin, M.V. (1999). *Oral Microbiology Fourth Edn.* p.23
- Martín, R., Langella, P. (2019). Emerging Health Concepts in the Probiotics Field: Streamlining the Definitions. *Front. Microbiology*, 10, 1047.
- McFarland, L. V. (2015). From Yaks to Yogurt. *Clinical Infectious Diseases*, 60, 85-90.
- McGrath, B.A., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Kelly, A.L. (2016). Composition and properties of bovine colostrum: a review. *Dairy Science & Technology*, 96, 133–158.
- Metchnikoff, E. (1908). *The prolongation of life: Optimistic studies.* New York: GP Putnam's Sons.
- Mishra, V., Shah, C., Mokeshe, N., Chavan, R., Yadav, H. and Prajapati, J. (2015). Probiotics as potential antioxidants: a systematic review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(14), 3615-3626.
- Mohamad, N. I., Manan, M. A., & Sani, N. A. (2019). Isolation and identification of lactic acid bacteria from local pickled mango with antibacterial potential. *In AIP Conference Proceedings*, AIP Publishing, 2111-50011.
- Monteagudo-Mera, A., Rodriguez-Aparicio, L., Martinez-Blanco, J., Rua, H., Navasa, N., Garcia-Armesto, M. R. ve Ferrero, M. A. (2012), “In vitro evaluation of

physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin,” *J. Funct. Foods*, 4, 531-541.

- Mourad, K. ve Nour-Eddine, K. (2006). Microbiological study of naturally fermented Algerian green olives: Isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts along with the effects of brine solutions obtained at the end of olive fermentation on *Lactobacillus plantarum*. *Grasas y Aceites*, 57; 292-300.
- Naidu, A. S., Bidlack, W. R., Clemens and R. A. (1999). Probiotic spectra of lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39(1), 13-126.
- NCCLS, 2006, National committee for clinical Laboratory Standards. Method for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, Approved standard. 7th ed. Wayne, PA, M7–A7 p.
- Nowak, W., Mikula, R., Zachwieja, A., Paczyńska, K., Pecka, E., Drzazga, K., Ślósarz, P. (2012). The Impact of Cow Nutrition in The Dry Period on Colostrum Quality and Immune Status of Calves. *Polish Journal of Veterinary Science*, 15 (1), 77-82.
- O’Sullivan, L., Ross, R.P., Hill, C. (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 5-6 (84), 593-604.
- Okochi, M., Sugita, T., Asai, Y., Tanaka, M., and Honda, H. (2017). Screening of peptides associated with adhesion and aggregation of *Lactobacillus rhamnosus* GG in vitro. *Biochemical Engineering Journal*, 128, 178-185.
- Oleskin, A.V., Shenderov, B.A. (2020). *Microbial Communication and Microbiota-Host Interactivity: Neurophysiological, Biotechnological, and Biopolitical Implications*; Nova Science Publishers: Hauppauge, USA: NY.
- Orla-Jensen, S. (1919) The lactic acid bacteria. E. Munksgaard (Ed.), Copenhagen.
- Ouwehand, A. C., Seppo, S., Tölkö, S., Robert, P., Ovaska, J. and Salminen, E. (2002). Resected human colonic tissue: New model for characterizing adhesion of lactic acid bacteria. *Clinical nad Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(1), 184-186.

- Özbaş, Y. (1993). Bifidobakterler ve *Lactobacillus acidophilus*: özellikleri, diyetetik amaçlar için kullanımları, yararlı etkileri ve ürün uygulamaları. *Gıda Teknolojileri Dergisi*, 18(4), 247-251.
- Özteber, M. (2013). *Fermente Süt Ürünlerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençliliklerinin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Belirlenmesi*. Aydın. Adnan Menderes Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi.
- Öztürk, N., M. Tunçel ve N.B. Tunçel. (2007). Determination of Phenolic Acids by a Modified HPLC: Its Application to Various Plant Materials, *J Liq Chromatogr* 30, 587-596 p
- Pakkanen, R. and Aalto, J. (1997). Growth Factors and Antimicrobial Factors of Bovine Colostrum. *International Dairy Journal*, 7, 285-297.
- Pannaraj, P.S., Li, F., Cerini, C., et all. (2017). Association Between Breast Milk Bacterial Communities and Establishment and Development of the Infant Gut Microbiome. *JAMA Pediatr*, 171 (7) ,647–654.
- Pereira, D. I. A. ve Gibson, G. (2002). Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 4689–4693.
- Playford, R.J., Weiser, M.J. (2021). Bovine Colostrum: Its Constituents and Uses. *Nutrients*, 13 (1), 265.
- Plessas, S.; Nouska, C.; Karapetsas, A.; Kazakos, S.; Alexopoulos, A.; Mantzourani, I.; Chondrou, P.; Fournomiti, M.; Galanis, A.; Bezirtzoglou, E. (2017) Isolation, characterization and evaluation of the probiotic potential of a novel *Lactobacillus* strain isolated from Feta-type cheese. *Food Chem.*, 226, 102–108.
- Quigley, L., O’Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D. (2012). The Complex Microbiota of Raw Milk. *FEMS Microbiology Reviews*, 37 (5), 664-698.

- Ramos, A.N., Sesto Cabral, M.E., Nosedá, D., Bosch, A., Yantorno, O.M., Valdez, J.C. (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.
- Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P. (2010). Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Annals of Biological Sciences*, 1(4), 218-228.
- Reniero R., Cocconcelli P.S., Bottazzi V., Morelli L. (1991). High frequency conjugation in *Lactobacillus* mediated by an aggregation promoting factor. *J. Gen. Microbiol.*, 138, 763-8.
- Rinkinen, M., Jalava, K., Westermarck, E., Salminen, S., and Ouwehand, A. C. (2003). Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization. *Veterinary Microbiology*, 92(1-2), 111-119.
- Rocha, J.M. (2016). On the Historical Background of Bovine Colostrum. *EC Nutrition*, 4 (6), 980-981.
- Rubio, R.C., Collado, M.C., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E., Mira, A. (2012). The Human Milk Microbiome Changes Over Lactation and is Shaped by Maternal Weight and Mode of Delivery. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 3 (96), 544-551.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mattö, J., and Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(3), 197-215.
- Sabin, A.B. ve Fieldsteel A.H. (1962). Antipoliomyelitic Activity of Human and Bovine Colostrum and Milk. *Pediatrics*, 29 (1), 105-115.
- Saboori, B.; Shahidi, F.; Hedayati, S.; Javadmanesh, A. (2022). Investigating the Probiotic Properties and Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from an Iranian Fermented Dairy Product, Kashk. *Foods*, 11, 3904.

- Salas-Jara, M.J., Ilabaca, A., Vega, M., García, A. (2016). Biofilm forming Lactobacillus: new challenges for the development of probiotics. *Microorganisms*, 4(35): 1-14.
- Salminen, S. Deighton, M.A., Benno, Y. and Gorbach, S.L. (1998). Lactic acid bacteria in health and disease. In: Salminen S., von Wright, A. eds. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc. 211-254.
- Salminen, S. and Wright, A. (2004). *Ouwehand A Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects* (3). Florida: CRC Press.
- Salminen, S., Collado, M.C., Endo, A., Tepesi, C., Lebeer, S., Quigley, E.M.M., Sanders, M.E., Shamir, R., Swann, J.R., Szajewska, H., Vinderola, G. (2021). The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 18, 649–667.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J., Saura-Calixto, F. (1998). A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270-276 p.
- Sangild, P.T., Vonderohe, C., Melendez Hebib, V., Burrin, D.G. (2021). Potential Benefits of Bovine Colostrum in Pediatric Nutrition and Health. *Nutrients*, 13 (8), 2551.
- Selma-Royo, M., Tarrazó, M., García-Mantrana, I., Gómez-Gallego, C., Salminen, S., Collado, M.C. (2019). Shaping Microbiota During the First 1000 Days of Life. *Adv Exp Med Biol*. 1125, 3-24.
- Shah, N.P. (2000). Effects of milk-derived bioactives: an overview. *British Journal of Nutrition*, 84 (S1), S3-S10.

- Shah, N. P. (2001). Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food Technology*, 55(11), 46-53.
- Shao, Y., Zhang, W., Gou, H., Pan, L., Zhang, H., Sun, T. (2015). Comparative studies on antibiotic resistance in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Food Control*, 50, 250-258.
- Shapiro, H.M. (2003). Practical Flow Cytometry. 4. *John Willey & Sons, Inc.*, Pp. 556-565. ISBN: 978-0-471-41125-3 Hoboken N.J. (Eds.)
- Sharma, N., Kang, D.K., Paik, H.D., vd. (2022). Beyond probiotics: a narrative review on an era of revolution. *Food Sci Biotechnol*.
- Sharma, R., Young, C., Mshvildadze, M., Neu, J. (2009). Intestinal microbiota: does it play a role in diseases of the neonate?. *Neoreviews*, 10, 166-179
- Shinde, P. B. (2012). Probiotic: an overview for selection and evaluation. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, 14-21.
- Silva, E.G., Rangel, A.H., Mürmam, L., Bezerra, M.F., Oliveira, J.F.(2019). Bovine Colostrum: Benefits of Its Use in Human Food. *Food Science and Technology*, 39 (2), 355-362.
- Siddhi, B.P., Pratik, Y., Ginpreet, K., Singh, T.H., Singh, B.H. (2020). Therapeutic Applications of Human and Bovine Colostrum in the Treatment of Gastrointestinal Diseases and Distinctive Cancer Types: The Current Evidence. *Frontiers in Pharmacology*, 11.
- Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P. S., Spier, M. R., Medeiros, A. B. P., Yamaguishi, C. T., Lindner, J. D., Pandey, A. and Thomaz-Soccol, V. (2010). The Potential of Probiotics: A Review. *Food Technology and Biotechnology*, 48(4), 413–434.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukic, S., Cirkovic, I. ve Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 115, 891–9.

- Stevens E.E., Patrick T.E., Pickler R. (2009). A History of Infant Feeding. *The Journal of Perinatal Education*, 18 (2), 32-39.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. (2020). Global Cancer Statistics. GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 71(3):209-249.
- Talib, N.; Mohamad, N.E.; Yeap, S.K.; Hussin, Y.; Aziz, M.N.M.; Masarudin, M.J.; Sharifuddin, S.A.; Hui, Y.W.; Ho, C.L.; Alitheen, N.B. (2019). Isolation and Characterization of *Lactobacillus* spp. from Kefir Samples in Malaysia. *Molecules*, 24, 2606.
- Tamer, A.Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, D., Bursalıoğlu, M., Oğultekin, R. (1989), 3. ve 4. Sınıf Mikrobiyoloji Laboratuvar Klavuzu, Anadolu Üniversitesi, Eğitim Sağlık ve Bilimsel Araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınları, No. 74, Eskişehir, 23-25, 240.
- Tannock, G. W. (2004). A Special Fondness for Lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3189–3194.
- Tareb, R., Bernardeau, M., Gueguen, M., Vernoux, J.P. (2013). *In vitro* characterization of aggregation and adhesion properties of viable and heat-killed forms of two probiotic *Lactobacillus* strains and interaction with foodborne zoonotic bacteria, especially *Campylobacter jejuni*. *Journal of Medical Microbiology*, 4(62).
- Thapa, B.R. (2005). Health factors in colostrum. *Indian J Pediatr*, 72, 579–581.
- Thapa, B.R. (2005). Therapeutic potentials of bovine colostrums. *Indian J Pediatr*, 72, 849-852.
- Tian, F. (2019). Section I Overview and Definition of Lactic Acid Bacteria. W. Chen (Ed.), *Lactic Acid Bacteria Omics and Functional Evaluation* (s. 1-34). Jiangnan University Wuxi, China: Springer.
- Todar, K. (2013) Online Textbook of Bacteriology, University of Wisconsin, Department of Bacteriology, United State.

- Tokatlı, M. (2013). *Ankara Çubuk yöresi turşularından izole edilen laktik asit bakterilerinin tanımlanmaları, teknolojik ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi ve starter olarak kullanılma olanaklarının değerlendirilmesi*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.
- Tolieng, V., Prasirtsak, B., Sitdhipol, J., Thongchul, N., and Tanasupawat, S. (2017). Identification and lactic acid production of bacteria isolated from soils and tree barks. *Malaysian Journal of Microbiology*, 13(2), 100-108.
- Trichopoulos, D., Lagiou, P. ve Adami, H.O. (2005). Towards an integrated model for breast cancer etiolog, the crucial role of the number of mammary tissuespecific stem cells. *Breast Cancer Res.*, 7(1),13-7.
- Tripathi, V., Vashishtha, B. (2006). Bioactive Compounds of Colostrum and Its Application. *Food Reviews International*, 22 (3), 225-244.
- Uruakpa, F.O., Akobundu, E.N.T. and Ismond, M.A.H. (2002). Colostrum and its benefits: a review. *Nutrition Research*, 22 (6), 755-767.
- Vahabnezhad, E., Mochon, A.B., Wozniak, L.J., Ziring, D.A. (2013). Lactobacillus Bacteremia Associated with Probiotic Use in a Pediatric Patient with Ulcerative Colitis. *J. Clin. Gastroenterol*, 437-439.
- van England, M., Nieland, L.J.W., Ramaekers, F.C.F., Shutte, B. Reutelingsperger, C.P.M. (1998). Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry.*, 31, 1-9.
- Von Wright, A. and Axelsson, L. (2011) Lactic Acid Bacteria: An Introduction. In: Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S. and Von Wright, A., (Ed)., *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (4).(s. 1-15). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Vyas U, Ranganathan N. (2012).Probiotics, prebiotics, and synbiotics: gut and beyond. *Gastroenterol Res Pract.*;872716.
- Wang, Y., Wu, Y., Wang, Y., Xu, H., Mei, X., Yu, D., and Li, W. (2017). Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients*, 9(5), 521.

- Wu, H., Shum, T.f., Chiou, j. (2021). Characterization of the Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Kimchi, Yogurt, and Baby Feces in Hong Kong and Their Performance in Soymilk Fermentation. *Microorganisms*, 9, 2544.
- Yeoman, C.J., Ishaq, S.L., Bichi, E., Olivo, S.K., Lowe, J., Aldridge, B.M. (2018). Biogeographical Differences in the Influence of Maternal Microbial Sources on the Early Successional Development of the Bovine Neonatal Gastrointestinal tract. *Scientific Reports*, 8, 3197.
- Yerlikaya, O., Karagözlü, C., Ender, G. ve Akbulut, N. (2008). Probiyotik Süt Ürünlerinde Ambalajlama. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, 21-23 Mayıs, Erzurum.
- Żółkiewicz J, Marzec A, Ruszczyński M, Feleszko W. (2020). Postbiotics - a step beyond pre-and probiotics. *Nutrients*. 12,2189.
- http-1: <https://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/probiotics.asp>
- http-2: https://www.atcc.org/products/htb-37?geo_country=tr